ENTWICKLUNG UND EINSATZ EINES POLYCHROMATISCHEN UV-DETEKTORS FÜR DIE HPLC-TRENNUNG -ANALYSE CHLORIERTER PFLANZENSCHUTZMITTEL

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegt der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

HANS-JÜRGEN STRECKERT
aus Witten

Bochum 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0053

ENTWICKLUNG UND EINSATZ EINES POLYCHROMATISCHEN UV-DETEKTORS FÜR DIE HPLC-TRENNUNG -ANALYSE CHLORIERTER PFLANZENSCHUTZMITTEL

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegt der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

HANS-JÜRGEN STRECKERT
aus Witten

Bochum 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

eingereicht am : 18.11.1982
mündliche Prüfung am : 17.12.1982

Vorsitzender : Prof. Dr. W. Kutzelnigg
Referent : Prof. Dr. G. Bergmann
Korreferent : PD Dr. H.-J. Götze
Dritter Prüfer : Prof. Dr. G. Snatzke

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1979 bis Juli 1982 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Bergmann für die Stellung des Themas, seine wertvollen Anregungen und die ständige Betreuung der Arbeit.

Allen Kollegen danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Ausgangsposition der Arbeit 5
   2.1 Literaturübersicht 5
   2.1.1 Analytik der polychlorierten Pestizide 5
   2.1.2 Auswahl der Meßmethode 7
   2.2 Problemstellung 12
3. Aufbau und Funktionssteuerung der Apparatur 14
   3.1 Aufbau der Meßapparatur 14
   3.1.1 Der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph 14
   3.1.2 Das Probendosiersystem 19
   3.1.3 Das Spektralphotometer 20
   3.1.4 Das Interface zur Wellenlängenansteuerung und Meßwerterfassung 22
   3.1.5 Die analoge Meßwertaufzeichnung 26
   3.2 Software zur Gerätesteuerung und Meßwerterfassung 27
   3.2.1 Das Programm HPLC für den zyklischen Betrieb der Meßstellenansteuerung 27
   3.2.2 Das Programm SCAN für die Registrierung von Spektren 32
4. Verfahrensparameter 34
   4.1 Bestimmung der Geräteparameter 34
   4.1.1 Die Durchflußkonstanz des Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen 34
   4.1.2 Die Reproduzierbarkeit der Probendosierung 36
   4.1.3 Die Richtigkeit des dosierten Probenvolumens 38
   4.1.4 Das Rauschen des Spektralphotometers 42
   4.1.5 Die Drift des Spektralphotometers 43
   4.1.6 Die Linearität des Spektralphotometers 44

4.1.7 Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Wellenlängenansteuerung 48
4.2 Chromatographisches Trennsystem 50
4.2.1 Trennsäulenfüllung 50
4.2.2 Charakterisierung und Prüfung der Trennsäule 52
4.2.3 Die Bestimmung der Totzeit in Reversed-Phase-Systemen 59
4.2.4 Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten unter isokratischen Bedingungen 62
4.2.5 Der Einfluß der Trennsäulentemperatur auf die Trennleistung 63
4.2.6 Der Einfluß des im Eluenten gelösten Sauerstoffs auf das Meßsignal 64
5. Gradienten-Elution 67
5.1 Die Durchflußkonstanz bei der Gradienten-Elution 68
5.2 Das Totvolumen im Gradientensystem 70
5.3 Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit unter den Bedingungen der Gradienten-Elution 72
5.4 Der Einfluß der Eluentenpolarität auf die Retentionszeit 75
5.5 Möglichkeiten zur Berechnung des Gradientenprogramms 80
6. Mehrkomponentenanalyse 85
6.1 Verwendete Substanzen 88
6.2 Die Auswahl der Meßstellen 90
6.3 Auswerteverfahren 95
6.3.1 Das integrale Verfahren 95
6.3.2 Das differentielle Verfahren 96
6.3.3 Das partielle Verfahren 97
6.4 Integrationsmethoden 99

6.4.1 Die Rechteckmethode 100
6.4.2 Das Simpsonsche Näherungsverfahren 103
6.4.3 Die exakte sukzessive Integration 105
6.4.4 Die exakte sukzessive Integration anschließend an eine Least-Squares-Anpassung 107
6.5 Prüfung der Linearität der Analysenfunktion 109
6.6 Die Nachweisgrenze 112
6.7 Das Zweikomponentensystem Methoxychlor, DDD 115
6.7.1 Modell 1: Zweikomponentenanalyse 117
6.7.2 Modell 2: Zweikomponentenanalyse nach vorhergehender Glättung der Chromatogramme 118
6.8 Das Vierkomponentensystem Methoxychlor, DDD, DDT, DDE 120
6.8.1 Modell 3: Reduktion auf Zweikomponentenanalysen 123
6.9 Das Sechskomponentensystem Methoxychlor, DDD, Dieldrin, DDT, DDE, Aldrin 126
6.9.1 Modell 4: Reduktion auf Zweikomponentenanalysen ohne Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen 129
6.9.2 Modell 5: Zweikomponentenanalysen mit Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen 132
6.9.3 Modell 6: Dreikomponentenanalyse der Substanzen DDT, DDE, Aldrin 135
7. Zusammenfassung 138
8. Literaturverzeichnis 140
9. Anhang 145
9.1 Die Auswertemethode 145

9.1.1 Die Analyse 145
9.1.2 Die Eichung 146
9.2 Rechenprogramme 148
9.2.1 EIPO 148
9.2.2 MECO 148
9.2.3 KURV 151
9.3 Versuchsbedingungen und Meßergebnisse aus Kapitel 6 153
9.4 UV-Spektren 167

1. Einleitung

Die Entwicklung und Produktion neuer chemischer Industriegüter stellt neue und wechselnde Anforderungen an die analytischen Arbeitsmethoden.
In der Produktionsüberwachung sind hierbei die Optimierung chemischer Prozesse, die erwünschte Reinheit der Produkte aber auch der Schutz von Bevölkerungsgruppen, die in Kontakt mit diesen Produkten gelangen, Ziele der Arbeit.
Das Chemikaliengesetz (Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen) vom 25. Juni 1980 schreibt toxikologische und physikalisch-chemische Untersuchungen für neu in den Handel gebrachte chemische Produkte vor. Der Prüfungsumfang ist abhängig von der produzierten Stoffmenge und umfaßt Haupt- und Nebenbestandteile.
Von den teilweise nur in Spuren vorhandenen Nebenbestandteilen geht gelegentlich ein höheres Risiko aus, wie z.B. im Falle des 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), das bei der Produktion des 2,4,5-Trichlorphenol entsteht.
Einen wesentlichen Aspekt des Chemikaliengesetzes stellt auch die Einbeziehung der Stoffmenge dar. Zu den in großer Menge hergestellten Chemikalien gehören die chemischen Pflanzenschutzmittel, deren Einsatz und Verbreitung allerdings schon durch frühere gesetzgeberische Maßnahmen reglementiert sind. Am Beispiel des DDT können die aus unkritischer Anwendung in großen Mengen resultierenden Auswirkungen einer zunächst nutzbringenden Chemikalie verdeutlicht werden.
1874 synthetisierte der deutsche Chemiker Zeidler

erstmals DDT. 1939 entdeckte P. Müller die insektizide Wirkung der Verbindung. In den folgenden Jahren konnte die Substanz auf verschiedenen Anwendungsgebieten mit Erfolg eingesetzt werden. 1948 wurde P. Müller für seine Entdeckung mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.
Der nachfolgende Einsatz des DDT in großen Mengen, verbunden mit der hohen Beständigkeit der Verbindung gegen chemische und mikroorganische Einflüsse, führen zu der heute zu beobachtenden (1) weltweiten Verbreitung. Auf Grund von negativen Auswirkungen durch diese ubiquitäre Anreicherung des DDT erfolgt ab 1970 in den Industriestaaten eine Einschränkung der Anwendung oder ein Verbot. In vielen Entwicklungsländern überwiegen die Vorteile des Insektizids, aus diesem Grund wird die Verbindung hier noch eingesetzt. Durch Nahrungsmittelexporte bleibt die Verteilung der Substanz auch hier nicht örtlich begrenzt.
Wegen der hier angeschnittenen Problematik ist die Überwachung des Einsatzes und der Verbreitung von Chemikalien notwendig. Die Kontrolle des Vorkommens einer Substanz stellt oft die Aufgabe einer Analyse in einer komplexen Matrix. Die Konzentrationsbestimmung soll dabei noch im Spurenbereich möglich sein. Möglichkeiten zur Lösung dieser Aufgabe bieten die modernen chromatographischen Verfahren.

Schon 1850 beschreibt Runge in seinem Buch "Zur Farbenchemie" die Wanderung von Farbstoffen auf Papier mit Wasser als flüssiger mobiler Phase.
Die Anwendung der Chromatographie zur Lösung analytischer Fragestellungen wird erstmals 1903 von dem Botaniker Tswett beschrieben (2,3). Tswett trennt

die Pflanzenfarbstoffe Karotin, Xantophyll und Chlorophyll mit Hilfe eines säulenchromatographischen Verfahrens. Die Bedeutung dieses Verfahrens zur Isolierung und Identifizierung von Naturstoffgemischen wird auch von Kuhn, Winterstein und Lederer erkannt (4), die die Adsorptionschromatographie 1931 erneut auf die Trennung von Pflanzenfarbstoffen anwenden. Die Verteilung hydrophiler Stoffe zwischen zwei flüssigen Phasen - und damit der Ursprung der Verteilungschromatographie - wird 1941 in einer Veröffentlichung von Martin und Synge (5) beschrieben; sie nutzen dieses Verfahren zur Trennung eines Aminosäurengemisches. Die Arbeit ist auch wegen der erstmaligen quantitativen Beschreibung des Trennprozesses mit Hilfe einer Bodentheorie erwähnenswert. Die Verfasser postulieren zur Leistungssteigerung in der Flüssigkeits-Chromatographie auch die Verwendung kleinerer Teilchen als stationäre Phase. Die konsequente Verfolgung dieses Ziels muß zwangsläufig zur Entwicklung der heutigen Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie führen. Damköhler und Theile (6) trennen Methanol-Äthanol- und Benzol-Cyclohexan-Gemische auf mit Glycerin belegtem Ton und schildern hiermit eine erste Anwendung der Gas-Verteilungschromatographie. Die Grundlagen der Gaschromatographie, die sich auf Grund der hervorragenden Trennleistungen seit 1958 zu einem Standardverfahren der modernen apparativen Analytik entwickelt hat, schaffen jedoch James und Martin (7) im Jahre 1952. Die weitere Entwicklung der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie erfolgt dann 1960 durch die Publikation von Hamilton, Bogue und Anderson (8), die die Partikelgröße der

stationären Phasen reduzieren und durch die Vergrößerung der zur Verfügung stehenden Oberfläche eine Verbesserung der Trennleistung erreichen.
Seit 1969 werden kommerzielle HPLC-Geräte hergestellt.

2. Ausgangsposition der Arbeit

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Analytik der polychlorierten Pestizide

Ziel der Analyse der polychlorierten Pestizide ist u.a. die Kontrolle ihrer Verbreitung, um durch einen gezielten Einsatz dieser Verbindungen deren negative Wirkungen zu minimieren.
Neben der eingesetzten Menge an polychlorierten Pestiziden ist die Persistenz dieser Verbindungen ausschlaggebend für ihre negativen Auswirkungen auf die Umwelt (9). Die Situation wird dadurch erschwert, daß einige Abbauprodukte dieser Substanzen ebenfalls umweltbelastende Eigenschaften aufweisen. Beispiele hierfür sind der Abbau des DDT zum DDE und der des Aldrin zum Dieldrin (10). Das Vorkommen der Pestizidrückstände ist, wie bereits erwähnt, heute nicht mehr allein auf die Anwendungsgebiete beschränkt. Ihr Nachweis ist sowohl im Meerwasser (1,10) als auch in arktischen Luftproben (11) möglich. Als logische Konsequenz dieser resultierenden Kontamination kann der Gehalt dieser Verbindungen in pflanzlichen Zellen und in tierischen und menschlichen Gewebeproben angesehen werden (10,12,13). Innerhalb der Nahrungskette kann hierbei eine Zunahme der gemessenen Konzentrationen festgestellt werden.
Kommerziell vertriebene Pflanzenschutzmittel bestehen meist aus mehreren Wirkstoffkomponenten, und enthalten zusätzlich noch Begleitstoffe wie z.B. Lösungsmittel, Netzmittel, Haftmittel und Emulgatoren.
Einen Extremfall stellt das Toxaphen dar, das

einschließlich aller Begleitstoffe aus ca. 180 Verbindungen besteht.
Aus diesem Grunde wird der Analyse in der Regel ein Trennverfahren vorangestellt.
Da die Analyse der chlorierten Pestizide Gegenstand einer Vielzahl von Veröffentlichungen ist, können an dieser Stelle nur einige Arbeiten exemplarisch genannt werden.
Cook (14) bedient sich zur Trennung der Insektizide der Papierchromatographie. Die Auftrennung der Komponenten Dieldrin und Endrin gelingt dabei nur unvollständig. Bessere Trennergebnisse liefert die Dünnschichtchromatographie (15,16). Die Gaschromatographie (11,13) und die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (17) bieten gute Trennleistungen bei kurzen Analysenzeiten.
In der Gaschromatographie steht mit dem EC-Detektor ein selektiver und empfindlicher Detektor zur Verfügung. Die anderen chromatographischen Methoden ziehen zur Detektion meist UV- oder Fluoreszenzmessungen heran. Durch eine Derivatisierung anschließend an die Trennung kann hierbei die Empfindlichkeit der Detektion verbessert werden.(18,19,20).
Auf Grund der hohen Selektivität wird trotz des großen apparativen Aufwandes auch die Massenspektrometrie zur Detektion der chromatographischen Eluate benutzt (21,22).
Bei sehr kleinen Pestizidkonzentrationen z.B. in Luftproben ist es oft notwendig, der Analyse einen Anreicherungsschritt voranzusetzen. Steinwandter (23) adsorbiert Pestizide aus Milchproben an Kieselgel. Nach der Elution mit Petrolether-Dichlormethan erfolgt die Analyse mit Hilfe der Gaschromatographie.

Bacaloni et. al. (24) benutzen Aktivkohle als Adsorptionsmittel. Auch Polyurethanschaum und Styrol-Divinylbenzol-Copolymere sind zur Anreicherung der polychlorierten Pestizide geeignet (25,26).

2.1.2 Auswahl der Meßmethode

Den Anforderungen an die Analysenmethode, die durch die Komponentenanzahl und die komplexe Matrix, wie sie z.B. eine Boden- oder Gewebeprobe darstellt, bei der Anaylse der polychlorierten Pestizide gegeben sind, genügen bezüglich Trennvermögen und Substanzbedarf die Dünnschichtchromatographie, die Gaschromatographie und die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. Im Hinblick auf eine Automatisierung des Verfahrens zur Durchführung von Routine-Messungen ist die Dünnschichtchromatographie den beiden anderen Methoden unterlegen (27). Durch die Entwicklung neuer stationärer Phasen und den Einsatz der Gradienten-Elution sind die Trennleistungen der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie denen der Gaschromatographie vergleichbar geworden (28). Die beiden Methoden sind jedoch nur in einem schmalen Überschneidungsbereich als Konkurrenz anzusehen, da bei der Gaschromatographie die Probe in den gasförmigen Zustand überführt werden muß. Bei hochsiedenden Verbindungen stellt dies eine thermische Belastung dar, die durch Zersetzungs- oder Verdampfungsverluste falsche Analysenergebnisse hervorrufen kann.
Ein wesentlicher Vorteil der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie ist durch die Möglichkeit der Probenanreicherung auf der Trennsäule und anschließender Elution mit einem Eluenten entsprechender Polarität

gegeben (29,30). Das Verfahren kann durch eine Säulenschaltung noch effektiver gestaltet werden.
Bei schlecht zu trennenden Substanzen führt die Gradienten-Elution zu einer Verbesserung der chromatographischen Auflösung. Thoms und Zander (31) wenden diese Technik mit Erfolg auf die Trennung von Polycyclen an. Zur Indentifizierung gehen sie dabei nach dem stop-and-go-Prinzip vor. Hierbei wird jeweils im Peakmaximum die Eluentenförderung unterbrochen und mit einer Scan-Vorrichtung ein UV-Spektrum aufgenommen. Es erweist sich als schwierig, sämtliche Komponenten in einem Verfahrensschritt zu trennen.
Lawrence und Turton (17) beschreiben für 166 Pestizide jeweils die optimalen chromatographischen Parameter. Eine Berücksichtigung dieser Arbeitsvorschriften muß zu einem aufwendigem mehrstufigen Trennverfahren führen.
Einen anderen Weg beschreiten Chen et. al. (32) und Zhang et. al. (33), sie versuchen durch eine Optimierung der Säulendimensionen zu einer besseren Auflösung zu gelangen. Die entwickelten Small-bore-Säulen zeichnen sich durch einen geringen Eluentenverbrauch und kleine dosierte Probemengen aus. Eine wesentliche Verbesserung der Trennleistung kann nicht erreicht werden. Ähnliche Ergebnisse erzielen Ryall und Kessler (34) mit Micro-bore-Säulen und Hirata und Novotny (35) mit Kapillarsäulen.
Auch mit den modernen Trennverfahren ist es folglich meist nicht möglich, sämtliche Komponenten eines Multikomponentengemisches aufzutrennen. In diesen Fällen führt die Anwendung der Mehrkomponentenanalyse mit einer selektiven spektrometrischen Detektion zu einer besseren Information über die Konzentration der

in der Probe enthaltenen Substanzen.
Die apparativen Grundlagen zur Durchführung einer spektrometrischen Mehrkomponentenanalyse werden von Lübbers und Niesel (36) mit dem Bau eines Kurzzeit-Spektralanalysators geschaffen. Klabuhn et. al. (37) führen ohne eine gesonderte Meßstellenauswahl eine Vierkomponentenanalyse an 200 Meßstellen im UV-Bereich durch. Zur Eichung benutzten sie die Reinsubstanzen.
Fechner und Seifert (38) beschreiben den Einsatz eines gleichzeitig bei zwei Wellenlängen registrierenden UV-Spektralphotometers zur Detektion von kondensierten Aromaten aus Luftproben im Anschluß an einen Anreicherungsschritt und eine Trennung durch die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed-Phase-Säule mit Acetonitril-Wasser als Eluent.
Den Einsatz eines Rechners zur Steuerung der Monochromatoreinstellung zwischen zwei vorjustierten Wellenlängen beschreiben Ratzlaff et. al. (39).
Einen Photodiodenarray-Detektor für Fluoreszenz- und Chemilumineszenz-Messungen benutzen Ryan et. al. in ihrer Arbeit (40). Die Leistungsfähigkeit dieses Detektors kann nur in Verbindung mit einem schnellen Rechner genutzt werden. Der Betrieb von zwei linearen Photodiodenarrays im Zweistrahlprinzip zur Analyse von Metaboliten einer carcinogenen Substanz wird von Dessy et. al. (41) veröffentlicht.
Die bisher beschriebenen Photodiodenarray-Detektoren bieten zwar den Vorteil quasisimultaner Registrierung von Spektren, die Auflösung und die Dynamik herkömmlicher Geräte ist bisher allerdings noch nicht erreicht worden.

Da eine Mehrkomponentenanalyse sehr rechenzeitintensiv wird, wenn sämtliche zur Verfügung stehenden Meßstellen genutzt werden, andererseits aber eine hohe Empfindlichkeit und Unterschiede im Verlauf der Spektren erwünscht sind, scheint eine Meßstellenauswahl angebracht.
Eine geeignete Meßstellenauswahl für die Mehrkomponentenanalyse wird von Junker und Bergmann (42,43,44) beschrieben; Auswahlkriterium stellen die Totalempfindlichkeit und die Systemdistension dar. Eine Bewertung der Mehrkomponentenanalyse mit Hilfe der neu definierten Begriffe Empfindlichkeit und Selektivität gelingt Zinn (45). Staat (46) wendet die Mehrkomponentenanalyse auf die Analyse polycyclischer Aromaten in einem säulenchromatographischen Eluat an. Zur Detektion wird ein mechanisch gesteuertes polychromatisches UV-Spektralphotometer benutzt. Die Auswertung erfolgt mit einem Analogrechner.
Klukas (47) verwendet zur Analyse kondensierter Aromaten eine Gerätekombination bestehend aus einem Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen, einem UV-Spektralphotometer und einem Meßstellenwähler, einer digitalen Steuereinheit, die es erlaubt, bis zu 10 Meßstellen zyklisch anzufahren. Die Auswertung der Meßwerte erfolgt off-line mit einem Großrechner.
Liekmeier (48) benutzt ein schnell-scannendes UV-Spektralphotometer für kinetische Untersuchungen. Für die Steuerung des Gerätes und die Meßwerterfassung setzt Liekmeier einen Mikroprozessor ein.
Jacob (49) beschreibt die Analyse eines mit einer hydrostatischen Säule angetrennten Polycyclen-Gemisches mit einem Photodiodenarray-Detektor. Zur Meßwerterfassung dient ein Mikroprozessor; die

Auswertung erfolgt auf einem Laborrechner. Eine Optimierung der chromatographischen Parameter erfolgt nicht. Aus diesem Grunde erfordert die Analyse eine relativ hohe Substanzmenge.

2.2 Problemstellung

Die Analyse der polychlorierten Pestizide setzt ein leistungsfähiges Trennverfahren voraus. Das Verfahren sollte automatisierbar und für den Routine-Betrieb geeignet sein. Da es unter Routine-Bedingungen nicht möglich ist, eine vollständige Trennung sämtlicher Komponenten zu erreichen, muß für nicht vollständig aufgetrennte Peaks eine Mehrkomponentenanalyse durchgeführt werden. Hierzu ist ein selektiver Detektor erforderlich. Die Auswertung muß zweckmäßigerweise auf einem Rechner erfolgen. In dieser Arbeit sollten zur Erstellung des Analysenverfahrens folgende Aufgabenschwerpunkte behandelt werden:

1. Es mußte eine Gerätekombination bestehend aus einem Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen, einem Spektralphotometer und einem Rechner einschließlich Interface aufgebaut werden. Zur Verbesserung der Trennleistung sollte der Chromatograph die Möglichkeit der Gradienten-Elution bieten.
2. Die Funktion des Spektralphotometers sollte für die Durchführung einer Mehrkomponentenanalyse erweitert werden. Hierzu mußte ein Interface zur rechnergesteuerten elektromechanischen Wellenlängenänderung und zur digitalen Meßwerterfassung konstruiert werden.
3. Die Software zur Gerätesteuerung und Meßwerterfassung war zu erstellen. Die Auswertung der Meßwerte sollte mit Hilfe zu erstellender Auswerteprogramme erfolgen. Hierzu mußte ein geeignetes Auswerteverfahren ausgewählt werden. Für die Integration der Peaks sollten unterschiedliche Integrationsmethoden auf ihre Eignung und die Grenzen ihrer Anwendbarkeit

untersucht werden.

4. Zur Spezifizierung des Verfahrens mußten die Geräteparameter unter isokratischen Bedingungen und für die Gradienten-Elution bestimmt werden. Der Einfluß der Geräteparameter auf die Analysenergebnisse sollte beurteilt werden.

5. Die Anwendung des entwickelten Verfahrens auf die Analyse von Modellsystemen sollte zur Demonstration der Leistungsfähigkeit herangezogen werden.
Eine Abschätzung der Verfahrensfehler sollte aus den Parametern der Modelle erfolgen. Ein Vergleich mit den erhaltenen Sollwertabweichungen sollte durchgeführt werden.

3. Aufbau und Funktionssteuerung der Apparatur

3.1 Aufbau der Meßapparatur

Der Aufbau der Meßapparatur ist aus Abbildung 3.1 ersichtlich. Eine Einteilung in den modular aufgebauten Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen, einschließlich Probendosiersystem, den UV-Detektor und den zur Steuerung und Datenerfassung dienenden Rechner einschließlich Interface ist möglich.
Neben der rechnergesteuerten Betriebsweise ist auch die monochromatische UV-Detektion mit der analogen Meßwertaufzeichnung auf einem Kompensationsschreiber oder mit Anschluß eines kommerziellen Integrators möglich.

3.1.1 Der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph

Der verwendete Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph* ist für die Gradienten-Elution konzipiert. Er besteht aus zwei identischen Kurzhub-Doppelkolbenpumpen**, dem Gradientensteuergerät*** und dem Hochtemperaturofen**** zur Aufnahme der Trennsäulen. Die Pumpen haben die Aufgabe, den Eluenten in die Trennsäule zu fördern.
Die Flüssigkeit wird hierzu im Ansaugtakt über je

* Knauer-Flüssigkeits-Chromatograph, Dr. H. Knauer KG, Oberursel
** Typ 52.00, Dr. H. Knauer KG, Oberursel
*** Typ 760/36, Applied Chromatography Systems, Luton, Bedfordshire, England
**** Typ 60.00, Dr. H. Knauer KG, Oberursel

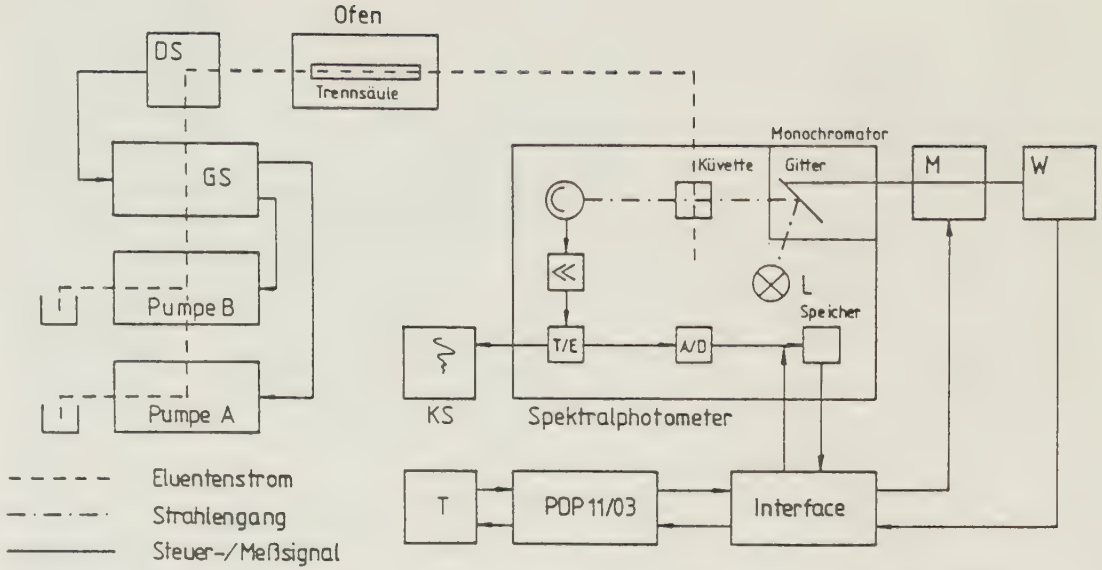


Abb. 3.1 Aufbau der Meßapparatur aus dem Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen, dem Spektralphotometer und dem Rechner (GS=Gradientensteuergerät; DS=Probendosiersystem; M=Antriebsmotor; W=Winkelcodierer; KS=Kompensationsschreiber; T=Terminal; L=Lichtquelle)

ein Kugelventil in einen der beiden Pumpenzylinder gesaugt. Die Ventile haben Rubinkugeln mit einem Saphirsitz. Um feste Verunreinigungen aus dem Eluenten zu eliminieren, ist den Pumpenköpfen ein Mikrosieb mit aufgesintertem Metallfaservlies vorgeschaltet. Der Pumpenkolben, ein in eine Saphirlaufbuchse eingeschliffener Saphirkolben, fördert über ein den Einlaßventilen analog aufgebautes Auslaßventil in den Druckaufnehmerblock. Hier vereinigen sich die Eluentenströme beider Pumpenköpfe einer Pumpe; zusätzlich besteht die Möglichkeit den Ausgang einer zweiten Pumpe in den Druckaufnehmerblock der ersten Pumpe zu leiten. Der am Ausgang einer Pumpe anstehende Druck wird induktiv mittels eines Federrohrinstruments mit einer Tauchspule erfaßt. Jedes der beiden Geräte besitzt sowohl eine Maximaldruckabschaltung, die bei Überschreitung eines vorgewählten Maximaldrucks vor mechanischer Beschädigung schützt, als auch eine Minimaldruckabschaltung, die bei einer länger als zwei Minuten dauernden Unterschreitung des voreingestellten Grenzwertes die Förderung des Eluenten beendet. Die Minimaldruckabschaltung verhindert bei einer Undichtigkeit im System das Auslaufen des Lösungsmittels. Bedingt durch die hohe Zeitkonstante dieser Sicherheitseinrichtung können Probendosierungen nach der Stopped-Flow-Methode erfolgen. Der verwendete Pumpentyp ist für Arbeiten bis zu einem Maximaldruck von 400 bar ausgelegt. Die Volumengeschwindigkeit kann im Bereich zwischen 0,1 ml/min und 10,0 ml/min an einem Drehpotentiometer, das die jeweilige Drehzahl des Antriebsmotors steuert, vorgewählt werden.

Der Antriebsmotor treibt über ein Schneckengetriebe eine Nockenwelle an, die den Kolbenhub der beiden Kolbenstangen um 180° phasenverschoben bewirkt. Die Rückstellung der Kolbenstangen wird durch je eine Kolbenrückholfeder erreicht. Die Geometrie der Antriebsnocken ist so gestaltet, daß sich die beiden Förderhübe in Anfangs- und Endphase überschneiden und so ohne Nachschalten eines volumenreichen Dämpfungssystems eine konstante Förderrate resultiert. Die durch die unterschiedlichen Kompressibilitäten der Eluenten hervorgerufene Restpulsation wird durch eine mechanische Begrenzung des Kolbenhubes während der Rückholphase minimiert.
Die bei sehr kleinen Fördergeschwindigkeiten auftretenden Störungen durch die Getriebelose des Schneckengetriebes werden mit Hilfe einer nachjustierbaren Getriebebremse behoben.
Bei der Gradienten-Elution übernimmt das Gradientensteuergerät die Aufgabe der Drehzahlsteuerung der beiden Pumpenmotoren. Die Gesamtströmungsgeschwindigkeit und das Teilerverhältnis der Gesamtfördermenge sind hierfür am Steuergerät einstellbar. Der Gesamtstrom des Eluenten kann zwischen 0,1 ml/min und 9,9 ml/min in Schritten von 0,1 ml/min variiert werden. Der Einstellbereich für das Teilerverhältnis ist allerdings dadurch begrenzt, daß jede der Pumpen nur ab einer minimalen Flußrate von 0,1 ml/min reproduzierbar fördert.
Das Gradientenprogramm kann aus maximal 10 linearen Segmenten zusammengesetzt werden. Die Dauer der einzelnen Zeitsegmente ist zwischen 1 min und 99 min in Schritten von 1 min wählbar.
Die zeitliche Abfolge der Gradientenstufen, die eine

Steigung zwischen ±0% min^{-1} und ±10% min^{-1} aufweisen können, wird zunächst in einem random access memory (RAM) gespeichert. Die Aktivierung des Programms geschieht mit Hilfe einer Start-Taste. Die Gradientensteuerung und die Dauer der Zeitsegmente werden hierbei durch einen Taktgenerator kontrolliert.
Der Ablauf des Gradientenprogramms kann auf einem Kompensationsschreiber überwacht werden.
Das Steuergerät bietet die Möglichkeit, den Ablauf des Programms an einer beliebigen Stelle zu unterbrechen, um anschließend unter isokratischen Bedingungen weiterzuarbeiten. Die Eluentenförderung kann kurzzeitig, z.B. für eine Probendosierung nach der Stopped-Flow-Methode, angehalten werden.
Die Eluentenmischkammer mit einem Mikromagnetrührer sorgt für eine gleichmäßige Vermischung schwer mischbarer Flüssigkeiten. Der Eluentenstrom wird über eine Probendosiereinrichtung auf die Trennsäule geleitet. Wegen der starken Temperaturabhängigkeit der für die Trennung verantwortlichen Adsorptions- und Verteilungsprozesse ist die Trennsäule in einem Säulenofen thermostatisiert. Die Temperaturregelung des Ofens reagiert auf Temperaturänderungen von ±0,01°C.

3.1.2 Das Probendosiersystem

Es wurde ein Hochdruck-Dosiersystem* mit auswechselbaren Probenschleifen verwendet. Es standen Dosierschleifen mit Volumina zwischen 10 µl und 2 ml zur Verfügung; für die analytischen Messungen wurde in der Regel ein Probenvolumen von 20 µl dosiert. Die Dosierschleifen sind mit Schraubverbindungen an das Dosiersystem angeschlossen und mit Hilfe von Schneidringen abgedichtet. Die Dosierung der Probe geschieht durch Betätigung eines Drehschiebers, der gleichzeitig eine Dichtefunktion ausübt (vgl. Abb. 4.2). Die Füllung der Probenschleife erfolgt mit einer µl-Spritze, die in der Ladestellung des Dosiersystems in einen Teflonkonus eingeführt wird, der in die Probenschleife mündet. Es besteht die Möglichkeit, die Probenschleife vollständig oder durch Abmessung des zu dosierenden Volumens mit einer geeichten µl-Spritze teilweise zu füllen. Die Verbindung des Dosiersystems mit der Trennsäule bildet eine Edelstahlkapillare (l = 5 cm; Innen-Ø = 0,25 mm). Mit einem resultierenden Volumen von 2,5 mm^3 = $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ ml ist die Forderung nach einer on-column-injection hinreichend erfüllt. An dem Dosiersystem wurde ein Mikroschalter angebracht, der bei der Probendosierung kurzzeitig geschlossen wird. Über einen Wahlschalter ist diese Einrichtung parallel zur Start-Taste des Gradientensteuergerätes geschaltet. Auf diese Art und Weise ist es nun möglich, das Gradientenprogramm reproduzierbar zu starten.

* Typ 7125, Rheodyne, Berkeley, California, USA

3.1.3 Das Spektralphotometer

Als Detektor wird ein Spektralphotometer* verwendet. Der Meßbereich des Gerätes erstreckt sich von 200 nm bis 850 nm. Im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 350 nm dient eine Deuteriumlampe (H3ODS) als Lichtquelle; Messungen im Bereich zwischen 290 nm und 850 nm können mit Hilfe einer Wolfram-Halogenlampe ausgeführt werden. Als dispergierendes Element wird ein Gitter-Einfachmonochromator mit einer spektralen Bandbreite von 10 nm verwendet. Die Wellenlängeneinstellung erfolgt mit Hilfe einer Monochromatorwelle. Die Wellenlängenanzeige erfolgt mechanisch mit einem von der Monochromatorwelle angetriebenen Zählrad in 1 nm-Abstufungen.
Das Eluat des Chromatographen wird durch eine Quarzdurchflußküvette mit einem Volumen von 8 µl (Schichtdicke d = 1 cm) geleitet. Als Detektor wird eine Vakuumphotozelle benutzt. Das Signal wird verstärkt. Anschließend wird eine Transmissions-Extinktions-Wandlung durchgeführt. Da es sich bei dem verwendeten Spektralphotometer um ein Einstrahlgerät handelt, muß eine elektronische Untergrundkompensation erfolgen. Das Signal kann nun mit Hilfe analoger Meßgeräte weiterverarbeitet werden. Als Zeitkonstante des Gerätes für den analogen Datenausgang sind 0,15 s und 0,5 s wählbar.
Für die digitale Datenverarbeitung wird das Extinktionssignal analog-digital gewandelt. Die digitale Information wird nach jeder Wandlung zwischengespeichert und auf einer 3 1/2 -stelligen

* Typ PM 2 DLC, Carl Zeiss, Oberkochen

7-Segment-LED-Anzeige ausgegeben. Der Anzeigewert kann am Digitalausgang des Gerätes BCD-codiert parallel abgegriffen werden. Eine Einzelwertausgabe kann erfolgen; hierbei wird durch einen externen Impuls der aktuelle Meßwert bis zur Übernahme eines neuen Meßwertes zwischengespeichert und angezeigt.

Zur Bewältigung des Meßproblems mußte die Funktion des Spektralphotometers erweitert werden. Ziel der Arbeiten war die rechnerkontrollierte Wellenlängensteuerung. Der Antrieb der Monochromatorwelle erfolgt von einem Synchronmotor mit angeflanschtem Planetengetriebe über einen Zahnriemen. Es stehen 10 Getriebestufen zur Verfügung, die Umdrehungsgeschwindigkeiten der Monochromatorwelle zwischen 0,06 min^{-1} und 60 min^{-1} erlauben.
Für den Eingriff des Antriebs wurde die Monochromatorwelle verlängert und aus dem Gehäuse herausgeführt. Es gelang mit Hilfe eines Lagerbocks, die Welle durch ein Kugellager soweit zu stabilisieren, daß auch hohe Umdrehungsgeschwindigkeiten möglich sind. Damit bei einem Fehler in der Steuerung die Monochromatoraufhängung nicht beschädigt werden kann, wird über eine Zahnriemenuntersetzung eine Welle mit Endnocken angetrieben; der Endnocken unterbricht durch Berührung eines Mikroschalters die Stromzufuhr zum Antriebsmotor. Eine Umdrehung der Monochromatorwelle entspricht einer Wellenlängendifferenz von 50 nm. Die Position der Wellenlängeneinstellung wird von einem optischen Encoder* er-

* Typ CD 105-200, TWK-Elektronik GmbH, Düsseldorf

faßt, der über ein spielfreies Kardangelenk direkt mit der Monochromatorwelle verbunden ist. Der Encoder ist gray-codiert und erlaubt eine Gesamtschrittzahl von 4096 bis zur Wiederholung. Die Positionsauflösung beträgt 4 Schritte pro nm.

3.1.4 Das Interface zur Wellenlängenansteuerung und Meßwerterfassung

Das Interface stellt die Verbindung zwischen dem Spektralphotometer und dem Rechner* her. Es stand eine Schnittstelle DRV-11 zur Verfügung.
Aufgabe des Interface ist die Positionserfassung der Wellenlänge mit Hilfe des optischen Encoders, die Übertragung der Motorsteuersignale, die Auslösung der Meßwertübernahme in den Zwischenspeicher des Spektralphotometers und die Übertragung der Meßdaten zur anschließenden weiteren Verarbeitung auf den Rechner.
Sämtliche Signalleitungen sind im Interface elektrisch durch Optokoppler getrennt. Die Motorsteuerung ist abhängig von dem Pegel der Start-Stop- und der Vor-Rück-Leitungen.
Zehn Bit des Winkelcodierers werden parallel auf die Schnittstelle des Rechners übertragen. Durch die Software wird der anliegende Gray-Wert im Zeit-

* PDP 11/03, Digital Equipment Corporation, Maynard, Massachusetts, USA

Ich danke den Herren Ing. grad. R. Singer J. Schröder und U. Spitz für Ihre Unterstützung beim Aufbau des Interface.

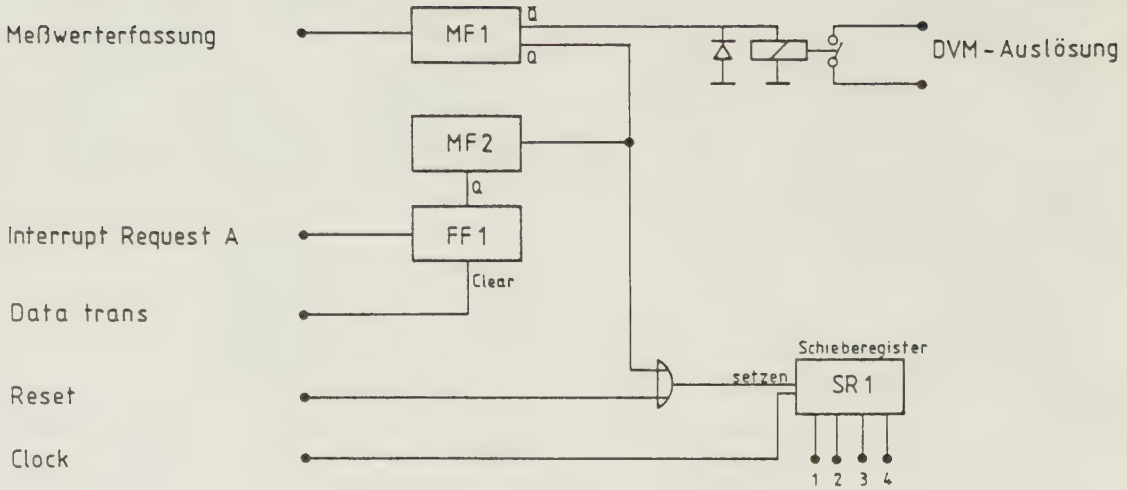


Abb. 3.2 Prinzipieller Aufbau des Interface; Funktion s. Text
(MF=Monoflop; FF=Flipflop; SR=Schieberegister)

takt der Timer-Routine in den entsprechenden Dezimalwert gewandelt und mit einem Sollwert verglichen. Bei Übereinstimmung beider Werte und der gewünschten Motordrehrichtung wird der Motor gestoppt und der Impuls Meßwerterfassung gesendet. Hierdurch wird das Monoflop MF1 gesetzt. Der Ausgang $\overline{Q}$ des Monoflops MF1 bewirkt über ein Reed-Relais die Auslösung des Digitalvoltmeters am Spektralphotometer.
Durch den Ausgang Q wird das Schieberegister SR1 zur decadenweisen Übertragung des BCD-codierten Meßwertes vorbereitet. Die abfallende Flanke dieses Impulses bewirkt mit Hilfe des Monoflops MF2 ein Setzen des Flipflops FF1. Das resultierende Ausgangssignal Interrupt-Request A zeigt an, daß ein Meßwert zur Übertragung auf den Rechner anliegt. Ist der Rechner zum Empfang des Meßwertes bereit, wird mit dem Data-trans-Impuls quittiert. Hierdurch wird das Signal Interrupt-Request A zurückgesetzt. Durch den Clock-Impuls des Rechners werden nun nacheinander die vier Ausgänge des Schieberegisters einzeln gesetzt. Mit Hilfe einer logischen Verknüpfung werden die vier Bit einer Dekade des Meßwertes seriell übertragen. Die Rücksetzung des Schieberegisters kann durch einen weiteren Clock-Impuls,einen Reset-Impuls oder einen neuen Meßwerterfassungs-Implus erfolgen.

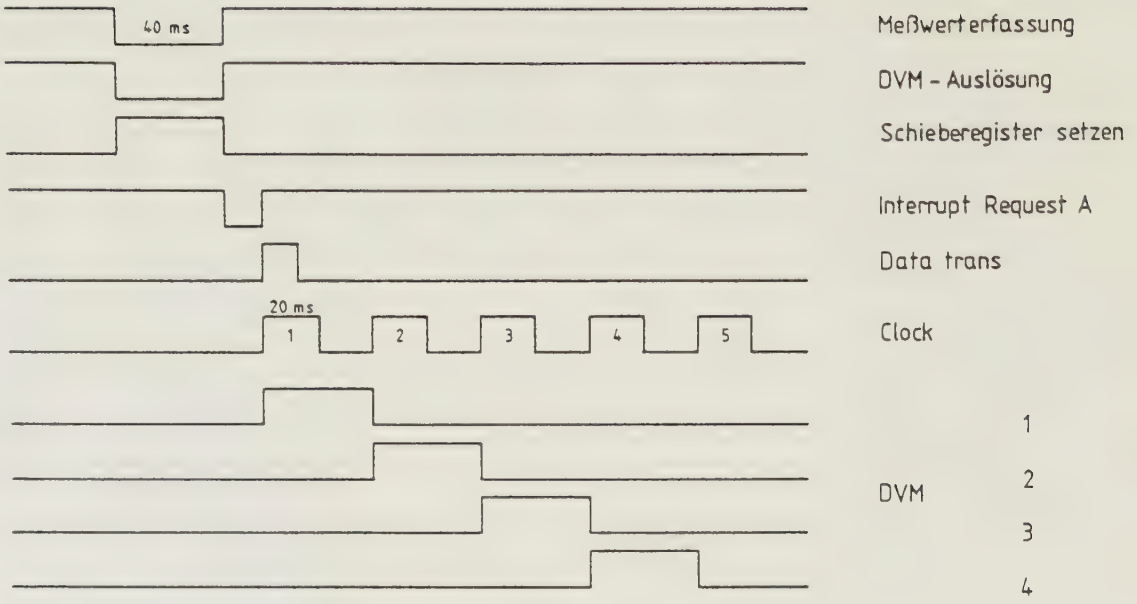


Abb. 3.3 Zeitablaufdiagramm für das Interface
(DVM i = Dezimalstelle des Digitalvoltmeters)

3.1.5 Die analoge Meßwertaufzeichnung

Zur analogen Meßwertaufzeichnung wird ein Zweikanal-Kompensations-Linienschreiber* eingesetzt. Dieses Gerät gestattet die gleichzeitige Echtzeit-Kontrolle des Chromatogramms und des dazugehörigen Gradientenprogramms. Bei zyklischer Wellenlängenansteuerung des Spektralphotometers können die Envelopen des resultierenden Strichchromatogramms den Verlauf der Trennung dokumentieren.

* Typ 42.00, Dr. H. Knauer, Oberursel

3.2 Software zur Gerätesteuerung und Meßwerterfassung

Die beiden Betriebsprogramme HPLC und SCAN sind in FORTRAN IV erstellt worden; auf Grund der relativ geringen Meßdatendichte ergaben sich keine Zeitprobleme. Die Programme sind im Vordergrund-Betrieb lauffähig, wenn ein Foreground-background-Monitor zur Verfügung steht.

3.2.1 Das Programm HPLC für den zyklischen Betrieb der Meßstellenansteuerung

Das Flußdiagramm des Programms HPLC ist in Abbildung 3.4 aufgelistet. Dieses Programm steuert das zyklische Anfahren von bis zu 18 Meßstellen und die resultierende Meßwerterfassung. Die Meßwerte werden hierbei zur weiteren Auswertung zunächst auf eine Wechselplatte geschrieben. Das Eröffnen der Meßdatei und die Eingabe der Steuerdaten geschieht mit Hilfe eines KB-Handlers auf einem peripheren Eingabegerät direkt am Arbeitsplatz.
Um bei der Meßstellenansteuerung eine möglichst hohe Wellenlängenreproduzierbarkeit zu erreichen, werden grundsätzlich alle Meßstellen in aufsteigender Reihenfolge angefahren; hierdurch wird der Einfluß der Lose des Monochromatorantriebs ausgeschaltet. Beim Rücklauf und beim Anfahren der ersten Meßstelle von einer höheren Wellenlänge aus findet ein Überschwingen um 1,25 nm = 5 Winkel-

Ich danke Frau Ing. grad. H. Moosecker für die Erstellung der Interrupt-Service-Routine.

werte statt.
Da die Mechanik der Wellenlängenansteuerung ein relativ großes Trägheitsmoment besitzt, kommt es beim Anhalten des Motors zu einem von der Umdrehungsgeschwindigkeit der Monochromatorwelle abhängigen Nachlauf, der durch einen entsprechenden Vorhalt kompensiert werden muß.

Umdrehungen der Monochromatorwelle (min^{-1})	Vorhalt (Winkelcodiererschritte)
< 6	0
12	1
30	4
60	7

Tab. 3.1 Wahl des Vorhalts in Abhängigkeit von der Umdrehungsgeschwindigkeit der Monochromatorwelle

Während des Motorlaufs wird die Positionserfassung über eine Timer-Routine betrieben; ein Halt-Kriterium wird zur Motorsteuerung herangezogen. Die Übertragung der Daten geschieht Interrupt-gesteuert mit einer Baud-Rate von 1200. Da die Meßwerte seriell übertragen werden, müssen sie mit dem FUNKTION-Unterprogramm MESZIF in dezimale Werte gewandelt werden.

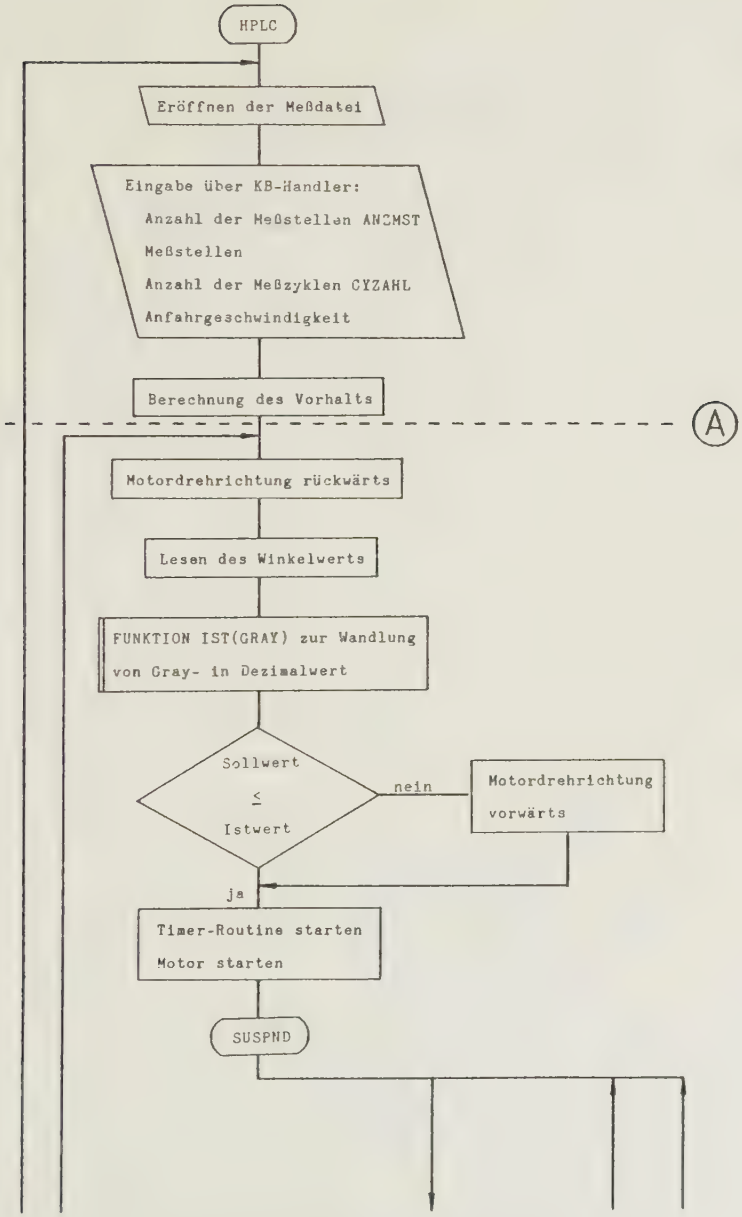


Abb.3.4 Flußdiagramm des Programms HPLC

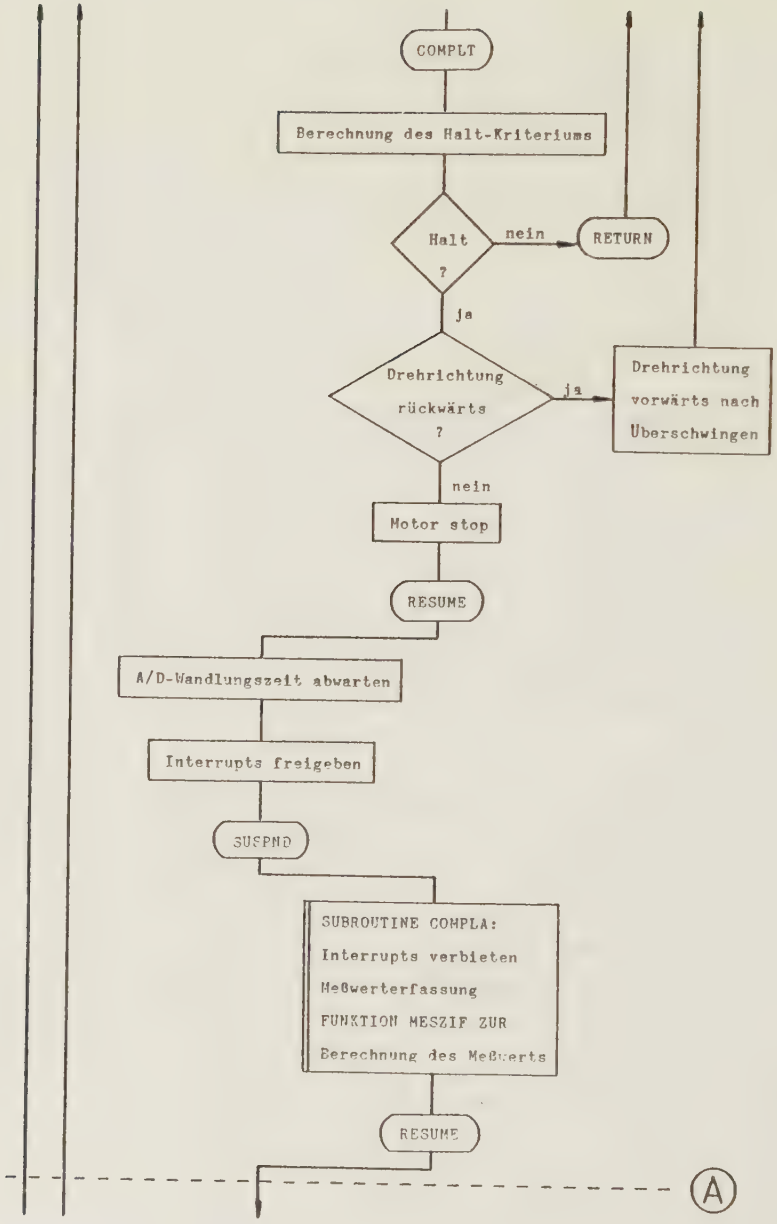


Abb. 3.4 Flußdiagramm des Programms HPLC (Fortsetzung)

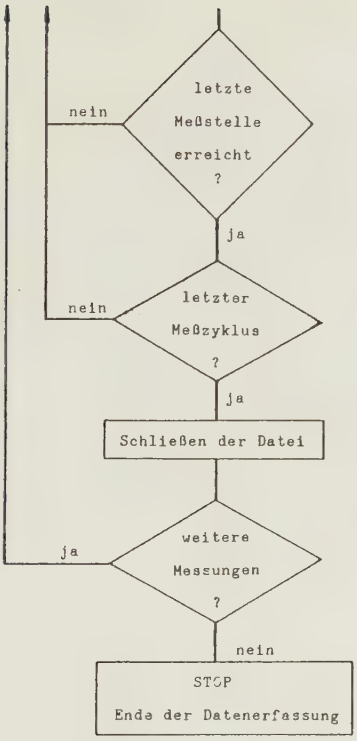


Abb. 3.4 Flußdiagramm des Programms HPLC (Fortsetzung)
(SUSPND und RESUME dienen zur Zeitsteuerung des Foreground-background-Betriebs)

3.2.2 Das Programm SCAN für die Registrierung von Spektren

Mit dem Programm SCAN kann die Aufnahme von UV-Spektren mit einer minimalen Schrittweite von 0,25 nm gesteuert werden. Das Programm ist in der Interrupt-Service-Routine weitgehend dem bereits beschriebenen Betriebsprogramm HPLC analog aufgebaut; die Unterschiede zum Programm HPLC sind aus Abbildung 3.5 ersichtlich.
Die Registrierung der Spektren geschieht in der Regel unter Stopped-Flow-Konditionen im Peakmaximum eines Chromatogramms. Da es sich beim verwendeten Spektralphotometer um ein Einstrahlgerät handelt, muß zur Untergrundkompensation ein Eluentenspektrum herangezogen werden.

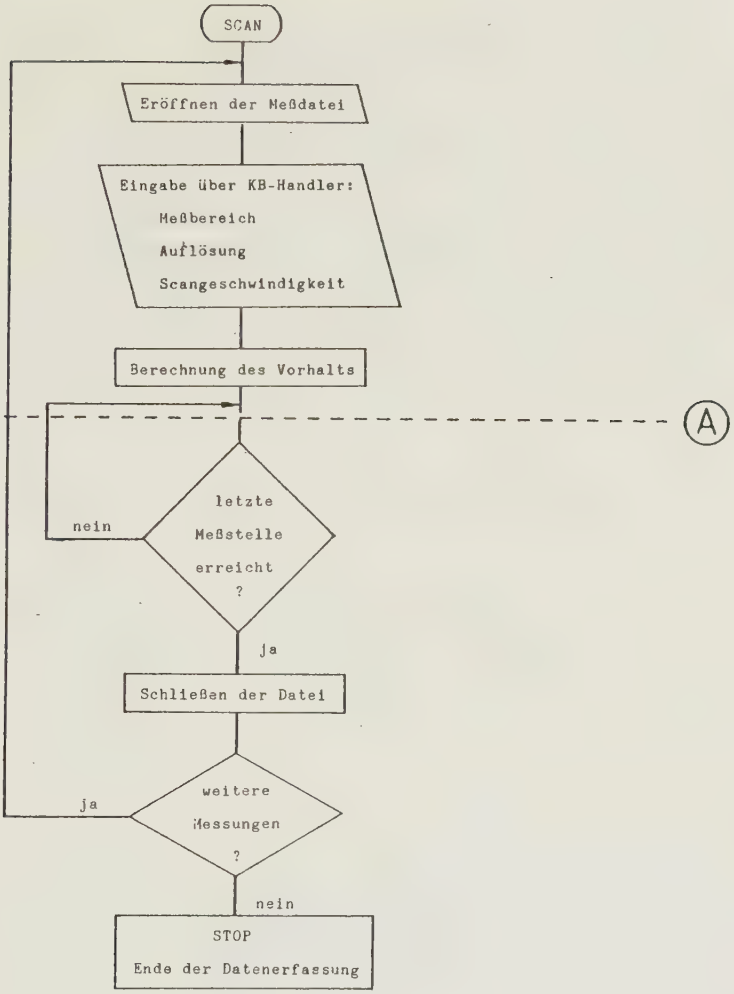


Abb. 3.5 Flußdiagramm des Programms SCAN
Einfügung der mit dem Progamm HPLC
identischen Teile bei Punkt A

4. Verfahrensparameter

4.1 Bestimmung der Geräteparameter

Bei der Durchführung quantitativer Analysen erhält man im allgemeinen Meßwerte, die mit einem Meßfehler behaftet sind. Der Meßfehler charakterisiert das Verfahren in Bezug auf Richtigkeit und Genauigkeit. Es muß zwischen Kurzzeitschwankungen und sich langfristig verändernden Komponenten unterschieden werden. Zur weiteren Beurteilung des Verfahrens müssen zusätzliche Aussagen über den zur Verfügung stehenden Meßbereich vorliegen.

4.1.1 Die Durchflußkonstanz des Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen

Die Durchflußkonstanz des Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen ist von ausschlaggebender Bedeutung bei der Peakflächenbestimmung, da in einem Chromatogramm die Änderung der Konzentration

$$A = \int_{t_1}^{t_2} c \cdot \frac{dV}{dt}\, dt \qquad (4.1)$$

t_1, t_2 = Integrationsgrenzen

als Funktion der Zeit registriert wird (vgl. 6.3.1). Zur Ermittlung der Durchflußkonstanz wurden drei Meßreihen aufgenommen. Für jede Meßreihe wurden 11 Messungen in einem zeitlichen Abstand von ca. 20 min vorgenommen.
Die Strömungsgeschwindigkeit resultiert in den Meßreihen 4.1 und 4.2 aus den Fördermengen der beiden Pumpen A und B; in der Meßreihe 4.3 kam lediglich

Pumpe A zum Einsatz. Der Eluent setzt sich in den beiden ersten Meßreihen additiv aus dem von Pumpe B gelieferten Methanol und einer von Pumpe A geförderten 1:1-Mischung aus Methanol und bidestillierten Wasser zusammen. In der Meßreihe 4.3 wurde die 1:1-Mischung gefördert. Diese Mischungskombination wurde verwendet, um schon außerhalb des chromatographischen Systems einen großen Teil der Mischungsenthalpie abführen zu können. Hierdurch konnte die Gasblasenbildung in der Apparatur verhindert werden. Die exakte Zumischung kleiner Wassergehalte gestaltete sich auf diese Weise ebenfalls problemloser. Der Druck wurde an einer mit Reversed-Phase-Material (RP-8 7µm) gepackten Trennsäule aufgebaut. Die Trennsäule war auf 34° thermostatisiert.

Meßreihe	4.1	4.2	4.3
σ_{CH_3OH}	0,875	0,800	0,500
σ_{H_2O}	0,125	0,200	0,500
$\dot{V}_o$ (ml/min)	0,999	0,715	0,799
s (10^{-3}ml/min)	2,09	1,60	3,72
s_{rel} (%)	0,21	0,22	0,47

Tab. 4.1 Bestimmung der Durchflußkonstanz des Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen
(σ_i = Volumenbruch der Komponente i
$\dot{V}_o$ = Strömungsgeschwindigkeit
s, s_{rel} = Schätzwerte der Standardabweichung aus jeweils 11 Einzelbestimmungen)

Zur Messung der Durchflußkonstanz wurde der Eluent nach dem Austritt aus der Trennsäule in eine 1 ml-Vollpipette geleitet, die auf 0,01 ml genau ablesbar war. Mit Hilfe einer Stoppuhr konnte auf 0,01 s genau die Zeit ermittelt werden, in der der Meniskus der Flüssigkeit die Strecke zwischen 0,00 ml und 0,80 ml durchlief.
Bei höheren Wassergehalten des Eluenten ist auf Grund der relativ hohen Oberflächenspannung des Wassers die Benetzung der Glasoberfläche schlechter. Dies dürfte der Grund für die Verschlechterung der Meßgenauigkeit in der Meßreihe der Tabelle 4.1 sein.
Diese Untersuchungen zeigen, daß der Durchfluß in allen Meßreihen eine hohe Konstanz aufweist.

4.1.2 Die Reproduzierbarkeit der Probendosierung

Für die Durchführung quantitativer Analysen ist eine gute Reproduzierbarkeit der Probendosierung erwünscht, da sonst mit einem internen Standard gearbeitet werden muß. Durch die Normierung mit einem internen Standard wird der Aufwand für eine Analyse jedoch erheblich vergrößert.
Eine Probe, die Fluoranthen ($c = 1{,}13 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und Chrysen ($c = 1{,}04 \cdot 10^{-4}$ mol/l) enthielt, wurde zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Probendosierung benutzt. Die Probe wurde mit einer Probenschleife dosiert, deren Volumen mit 20 µl angegeben war. Die Auftrennung der Komponenten geschah auf einer Kieselgelsäule (Si 60 7µm) mit Isooktan als Eluenten. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 1,5 ml/min. Die Detektion geschah bei einer Wellenlänge von 252 nm. Zur Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wurden

die Peakflächen mit einem elektronischen Integrator* ermittelt.

		Fluoranthen	Chrysen
mittlere Peakfläche (willkürliche Einheit)	$\bar{A}$	2743	9514
Standardabweichung	s	68	131
Variationskoeffizient (%)	s_{rel}	2,5	1,4

Tab. 4.2 Die Reproduzierbarkeit der Probendosierung aus 11 Dosierungen

Auf Grund der guten Reproduzierbarkeit der Probendosierung ist eine quantitative Analyse ohne das Hilfsmittel des internen Standards möglich.

* Typ HP 3380 A, Hewlett Packard, Böblingen

4.1.3 Die Richtigkeit des dosierten Probenvolumens

Für die Übertragbarkeit und Vergleichbarkeit der Meßergebnisse ist eine Feststellung der Richtigkeit des dosierten Probenvolumens erforderlich.
Hierzu wurden in den Meßreihen 4.4 und 4.5 unterschiedliche Probenvolumina einer Methoxychlorlösung ($c = 5{,}66 \cdot 10^{-4}$ mol/l) dosiert.
In der Meßreihe 4.4 wurde das dosierte Probenvolumen mit einer 25µl-Spritze abgemessen und in eine 20µl-Probenschleife gegeben. Zur Kontrolle wurde zudem noch ein Volumen von 10 µl mit einer 10µl-Spritze auf diese Weise dosiert. In der Meßreihe 4.5 erfolgte die Abmessung der dosierten Probenvolumina direkt durch unterschiedliche Probenschleifen mit dem jeweils angegebenen Volumen. Die Auswertung des Detektorsignals bei 228 nm erfolgte mit einem elektronischen Integrator*.
Die in Tabelle 4.3 aufgelisteten Peakflächen sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen. Die Peakflächen sind relativ zu der bei der Dosierung mit der 20µl-Probenschleife erhaltenen Fläche angegeben. Diese Probenschleife wurde, wenn es nicht besonders vermerkt ist, für alle weiteren Messungen verwendet.

Aus Abbildung 4.1 ist ersichtlich, daß für beide Meßreihen ein linearer Zusammenhang zwischen der Peakfläche und den dosierten Probenvolumen festzustellen ist.

* Typ HP 3370 A, Hewlett Packard, Böblingen

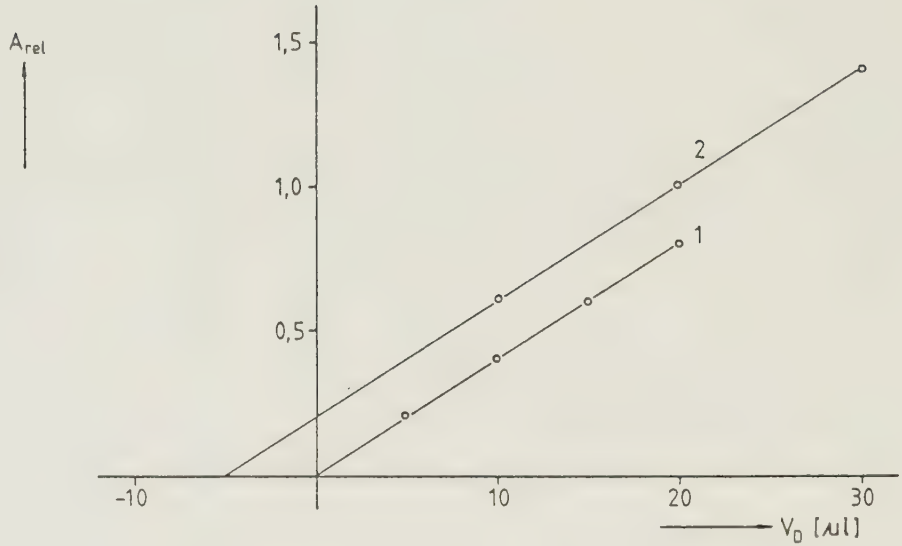


Abb. 4.1 Abhängigkeit der Peakflächen vom Probenvolumen
(1 = Dosierung mit µl-Spritzen (Meßreihe 4.4);
2 = Dosierung mit Probenschleifen (Meßreihe 4.5))

Meßreihe	4.4		4.5	
	V_D/µl	A_{rel}	V_D/µl	A_{rel}
	5	0,20	10	0,60
	10	0,40	20	1
	15	0,61	30	1,41
	20	0,80		
10µl-Spr.	10	0,40		

Tab. 4.3 Zusammenhang zwischen Peakflächen und dosiertem Probenvolumen für die Meßreihen 4.4 und 4.5
(V_D = Sollwert des Probenvolumens;
Säule : RP-8 7µm
Eluent: 87,5 % CH_3OH - 12,5% H_2O
$\dot{V}_o$ = 1,20 ml/min)

Bei der Abmessung des dosierten Volumens mittels einer µl-Spritze resultiert eine Ursprungsgerade, während im Falle der direkten Dosierung mit Probenschleifen eine hierzu parallel verschobene Gerade erhalten wird. Die Gerade 2 schneidet die Abszisse bei V_D = -5 µl. Dies bedeutet, daß bei der Abmessung des Probenvolumens mit Hilfe der unterschiedlichen Probenschleifen jeweils 5 µl zuviel dosiert werden.

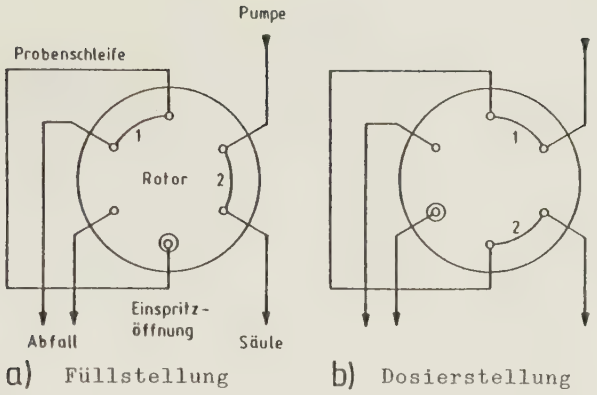


abb. 4.2 Funktion des Probendosiersystems

Aus Abbildung 4.2 a ist ersichtlich, daß bei einer vollständigen Füllung einer Probenschleife jeweils der Verbindungskanal 1 des Drehschiebers mitgefüllt wird. Bei der anschließenden Dosierung (Abb. 4.2 b) wird das Volumen dieses Verbindungskanals mitdosiert. Das Auslitern des Kanals 1 in einem demontierten Drehschieber bestätigt die Annahme, daß der beschriebene Effekt in Meßreihe 4.5 auf einen systematischen Fehler in der Dimensionierung der Probenschleife zurückzuführen ist.

4.1.4 Das Rauschen des Spektralphotometers

Das Rauschen des Spektralphotometers ist vom Hersteller mit 0,0004 in Extinktion angegeben. Am Spektralphotometer sind zwei Zeitkonstanten (0,15 s und 0,5 s) wählbar. Das verrauschte Signal wurde bei 245 nm von einem Komponsationsschreiber für beide Zeitkonstanten aufgezeichnet und graphisch ausgewertet. Die Messungen wurden jeweils ohne und mit Durchfluß ($\dot{V}_o$ = 1,002 ml/min; Eluent: Isooktan) ausgeführt.

Zeitkonstante T (s)	Rauschen ohne Durchfluß	$\frac{s_{0,15}}{s_{0,5}}$	Rauschen mit Durchfluß	$\frac{s_{0,15}}{s_{0,5}}$
0,15	0,00086	1,5	0,00093	1,5
0,5	0,00057		0,00062	

Tab. 4.4 Das Rauschen des Spektralphotometers bei 245 nm

Da die Anzeige des Spektralphotometers eine Druck- und Temperaturabhängigkeit aufweist, waren isokratische Arbeitsbedingungen für die Messungen erforderlich.
Aus Tabelle 4.4 ist ersichtlich, daß sich das Rauschen unter Berücksichtigung der Meßgenauigkeit dem $\sqrt{T}$-Gesetz ($\sigma = f(1/\sqrt{T})$) entsprechend verhält. Durch den Betrieb des Chromatographen wurde das

Rauschen nicht wesentlich erhöht. Für alle weiteren Messungen konnte auf Grund des relativ geringen Rauschens und der Tatsache, daß die digitale Meßwerterfassung lediglich mit einer Auflösung von $1 \cdot 10^{-3}$ in Extinktion erfolgte, die Zeitkonstante von 0,15 s gewählt werden.

4.1.5 Die Drift des Spektralphotometers

Die Drift des Spektralphotometers ist in erster Linie auf die zeitliche Inkonstanz des Strahlungsflusses und der Verstärkung zurückzuführen. Für die Aufnahme von Meßreihen sollte die Drift möglichst gering sein, um den Aufwand für Kalibrierungen zu minimieren. Die Herstellerangabe für die Drift beläuft sich auf 0,001 in 12 Stunden. Der gemessene Wert beträgt bei isokratischem Betrieb des Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,50 ml/min 0,003 in 5 Stunden.

4.1.6 Die Linearität des Spektralphotometers

Die Anwendbarkeit eines analytischen Verfahrens wird oft durch den nutzbaren Meßbereich bestimmt. Die untere Begrenzung des Konzentrationsbereiches ist definitionsgemäß durch die Nachweisgrenze gegeben. Nach oben ist der Meßbereich für photochemische Methoden durch den noch zu akzeptierenden maximalen Fehler begrenzt. Die Abweichung der Analysenfunktion von der Linearität kennzeichnet diesen Fehler. Zur Bestimmung der Linearität des Spektralphotometers wurden die Extinktionen von KJ-Lösungen in bidestilliertem Wasser bei einer Wellenlänge von 230 nm gemessen. Dieser Meßpunkt liegt auf der Absorptionsflanke des $KJ_{aqu.}$.

Lsg.	c_{KJ} (mol/l)	E	ε_s (l mol^{-1} cm^{-1})
1	$8{,}39 \cdot 10^{-6}$	0,068	8105
2	$4{,}20 \cdot 10^{-5}$	0,344	8190
3	$6{,}71 \cdot 10^{-5}$	0,544	8107
4	$8{,}39 \cdot 10^{-5}$	0,681	8117
5	$1{,}01 \cdot 10^{-4}$	0,804	7960
6	$1{,}26 \cdot 10^{-4}$	0,980	7778
7	$1{,}67 \cdot 10^{-4}$	1,231	7371

Tab. 4.5 Abhängigkeit des scheinbaren Extinktionskoeffizienten ε_s von der Extinktion der vermessenen KJ-Lösungen bei 230 nm

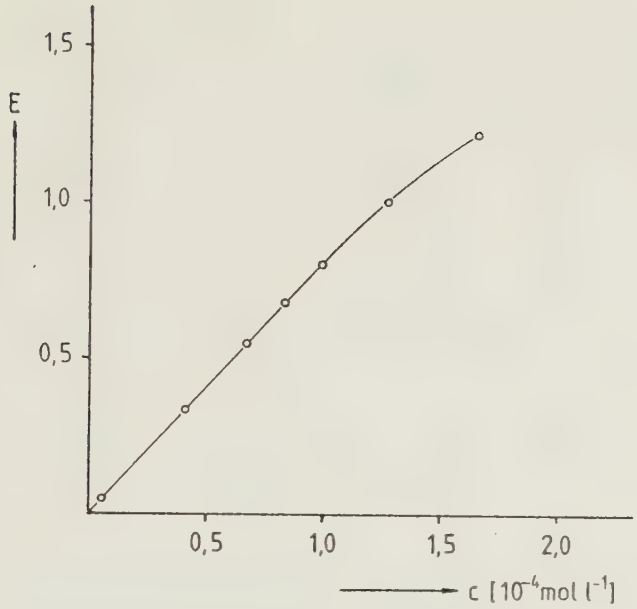


Abb. 4.3 Linearität des Spektralphotometers bei 230 nm für die KJ-Lösungen der Tab. 4.5

Aus der graphischen Auftragung der Meßergebnisse (Abb. 4.3) ist ersichtlich, daß der Meßbereich des Spektralphotometers bis zu einer Extinktion von 0,8 linear verläuft. Bei einer gemessenen Extinktion > 0,8 ist die Abhängigkeit der Meßwerte von der Probenkonzentration nicht mehr linear. Der Meßfehler, der durch diese Änderung der Empfindlichkeit hervorgerufen wird, nimmt, wie in Abbildung 4.4 dargestellt, zu größeren Extinktionen hin zu. Da es sich bei den vermessenen Proben um verdünnte Lösungen handelt, muß der Meßfehler auf die Abweichung des Spektral-

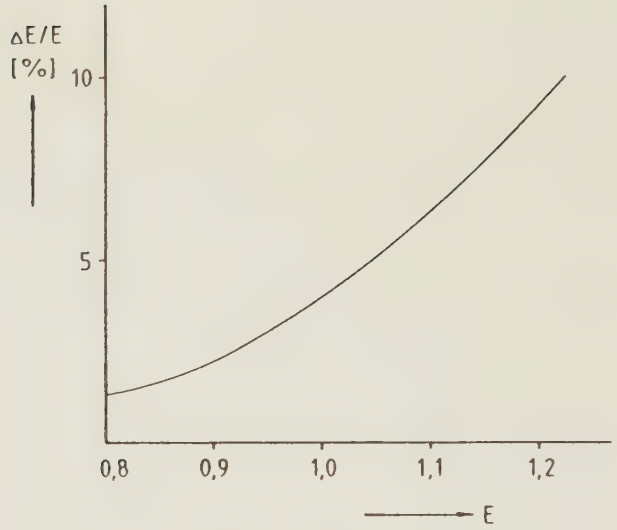


Abb. 4.4 Abhängigkeit des Meßfehlers vom Betrag des Meßwertes ermittelt aus den Meßwerten der Tab. 4.5

photometers von der Linearität zurückgeführt werden. Für chromatographische Messungen ist eine differenziertere Betrachtung notwendig.
In einem Chromatogramm verläßt ein Peak nur in einem Intervall um das Peakmaximum den linearen Bereich des Spektralphotometers (Abb. 4.5). Es wird also nur für dieses Intervall ein extinktionsabhängiger Meßfehler resultieren.
Der lineare Bereich des Spektralphotometers wird also für chromatographische Messungen scheinbar erweitert.
Es ist ersichtlich, daß für schmale Peaks der lineare

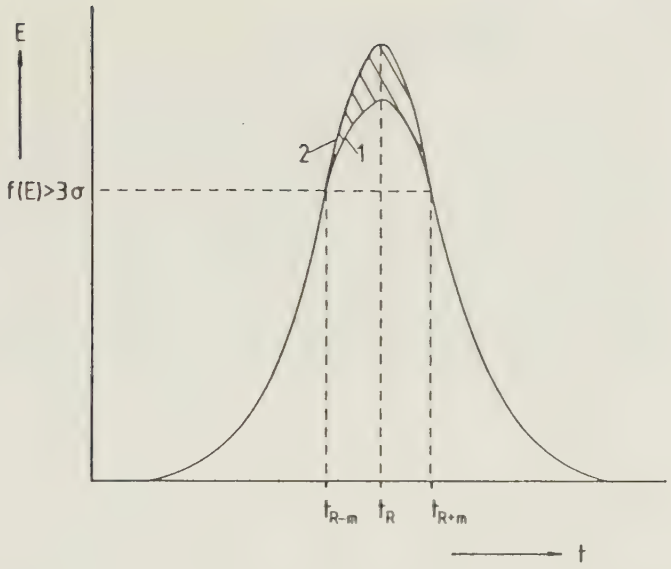


Abb. 4.5 Überschreitung des linearen Meßbereichs durch einen Peak im Intervall t_{R-m}, t_{R+m} (wahre Peakkontur (2); gemessene Peakkontur (1))

Bereich bei relativ kleineren dosierten Probemengen verlassen wird als bei breiteren Signalen, gleiche Empfindlichkeit vorausgesetzt. Durch eine Optimierung der chromatographischen Parameter läßt sich also lediglich die Nachweisgrenze herabsenken; die Empfindlichkeit des Verfahrens kann hierdurch nicht verbessert werden.

4.1.7 Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Wellenlängenansteuerung

Die Positionserfassung der Monochromatorwelle geschieht mit Hilfe des verwendeten optischen Encoders auf ±1 Bit (1,8°), entsprechend ±0,25 nm, genau. Zur Feststellung der Reproduzierbarkeit der Wellenlängenansteuerung wurden 6 Meßstellen, die über den gesamten bei späteren Messungen genutzten Wellenlängenbereich verteilt waren, je 40 mal zyklisch angefahren und vermessen. Um den Einfluß der Getriebelose bei der Meßstellenansteuerung auszuschalten, wurde bei der Erstellung der Software zur Gerätesteuerung (vgl. 3.2.1) berücksichtigt, daß die Meßstellen ausschließlich in Richtung aufsteigender Wellenlängen erfaßt werden. Die Geschwindigkeit des Monochromatorvorschubs betrug im Versuch 10 nm/s. Die Messungen wurden statisch an Isooktan vorgenommen. Eine Nullpunkt-Korrektur wurde nicht durchgeführt.

λ (nm)	222	228	234	242	251	265
$E \cdot 10^3$	748,9	566,7	418,5	280,0	178,1	120,3
$s \cdot 10^3$	0,52	0,60	0,51	0,51	0,27	0,47

Tab. 4.6 Meßwerte und Schätzwerte der Standardabweichung bestimmt aus 40 Meßzyklen

Die erhaltenen Schätzwerte der Standardabweichung sind im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch. Durch einen Vergleich dieser Werte mit dem ohne Durchfluß gemessenen Rauschen des Spektralphotometers

(Tab. 4.4 / T = 0,5 s) von 0,00057 wird ersichtlich, daß die bei zyklischer Wellenlängenansteuerung ermittelten Standardabweichungen in erster Linie vom Rauschen des Spektralphotometers bestimmt werden. Da sich die Meßwerte zwischen den Meßstellen stark ändern, muß sich eine schlechte Reproduzierbarkeit der Wellenlängenansteuerung in einer Vergrößerung des Schätzwerts der Standardabweichung ausdrücken. Dies ist nicht der Fall. Die Reproduzierbarkeit der Wellenlängenansteuerung ist gut genug,um selbst an steilen Absorptionsflanken Messungen auszuführen.

4.2 Chromatographisches Trennsystem

Zur Charakterisierung des angewandten Analysenverfahrens ist außer der vorangegangenen Bewertung der substanzunabhängigen Geräteparameter noch eine Beurteilung der stoffabhängigen chromatographischen Parameter erforderlich.

4.2.1 Trennsäulenfüllung

Die Eigenschaften einer Trennsäule hängen außer vom Füllmaterial auch stark von der Packung ab; aus diesem Grunde soll die Herstellung der verwendeten Trennsäulen beschrieben werden.
In der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie haben sich heute stationäre Phasen mit mittleren Teilchendurchmessern mit 5 bis 10 µm als Standardfüllmaterial durchgesetzt. Partikel dieser Größe weisen eine große relative Oberfläche auf; zudem stellt die Permeabilität der mit diesen Materialien gepackten Säulen keine zu großen Ansprüche an die benutzten Hochdruck-Pumpen. Ein weiterer Vorteil dieser kommerziell vertriebenen Packungsmaterialien ist die enge Korngrößenverteilung, die sich positiv auf die Peakverbreiterung in der Trennsäule auswirkt. Eine Beurteilung der gebräuchlichen Packungsmaterialien wird von Ohmacht und Halász (50,51) und von Hemetsberger (52,53) gegeben.
Bei der Verwendung von Säulenfüllmaterial mit Partikeldurchmessern von weniger als 20 µm führen Trockenfüllmethoden nicht mehr zu reproduzierbar gepackten Trennsäulen. Das von Kirkland (56) und Strubert (54) beschriebene Balanced-Density-Slurry-Verfahren konnte wegen des unpolaren Verhaltens

des Suspendiermittels für Reversed-Phase-Material keine Verwendung finden. Mit einem Suspendiermittel aus 70% Isopropanol und 30% Methanol konnten jedoch analog der Anleitung von Elgas (55) zur Packung von Kieselgelsäulen auch gute Reversed-Phase-Säulen gefüllt werden.
Es wurden Edelstahltrennsäulen* mit einer Länge von 25 cm und einen Innendurchmesser von 0,46 cm benutzt. Zur Füllung der Trennsäule wurden 2,3 g der stationären Phase** in 50 ml des Suspendiermittels eingebracht. Zur Vermeidung von Agglomerationen wurde die Suspension einige Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend konnte diese Aufschlämmung in die Füllapparatur gegeben werden. Aufgefüllt und nachgedrückt wurde mit Methanol. Der Fülldruck, der auf maximal 450 bar geregelt wurde, konnte mittels einer Haskel-Pumpe*** erzeugt werden. Die Füllzeiten betrugen zwischen 9 und 12 Minuten. Eine längere Konditionierung der nach dieser Methode gepackten Trennsäulen erübrigte sich, da das Suspendiermittel in später benutzten Eluenten löslich war und auf diese Weise leicht aus der stationären Phase zu entfernen war. Ein Ausbluten des Säulenmaterials wurde nicht beobachtet.

* Leersäule Best. Nr. 103.07.15, Dr. H. Knauer KG, Oberursel

** Li Chrosorb RP-8 7µm bzw. RP-18 10µm, E. Merck, Darmstadt

*** Haskel, Burbank, California, USA

4.2.2 Charakterisierung und Prüfung der Trennsäule

Das Trennvermögen der Trennsäule kann durch die Angabe von theoretischen Bodenzahlen n beschrieben werden.
Es gilt

$$n = 8 \cdot \ln 2 \cdot \left(\frac{t_R}{b_{0,5}}\right)^2 \qquad (4.2)$$

mit

t_R = Retentionszeit

$b_{0,5}$ = Halbwertsbreite eines Peaks

bzw. für die Höhe einer theoretischen Trennstufe h

$$h = \frac{L}{n} \qquad (4.2a)$$

L = Länge der Trennsäule

Voraussetzung ist, daß der eluierte Peak eine Gauß-Kontur aufweist. Diese Forderung kann durch die Auswahl der geeigneten Trennbedingungen in der Regel erfüllt werden.
Die nach der beschriebenen Methode gepackten Säulen weisen eine Gauß-Kontur ohne nennenswerte Asymmetrie auf. Die Kenngrößen, die nach Gleichung 4.2 und 4.2a ermittelt wurden, sind substanzspezifisch.
Um zu substanzunabhängigen Kennzahlen und so zu einer objektiven Bewertung von Trennsäulen zu gelangen, entwickelte Kaiser das ABT-Konzept (57,58). Er beschreibt das Trennvermögen der Säule durch die reale Trennstufenzahl

$$n_{real} = 8 \cdot \ln 2 \cdot \left(\frac{10t_0}{b_{10}-b_0} \right) \qquad (4.3)$$

t_0 = Totzeit

und die reale Trennstufenhöhe, die der Gleichung 4.2a ensprechend berechnet wird.

Die von ihm hierzu definierte Startpeakbreite b_0 ist die auf die Totzeit extrapolierte Peakhalbwertsbreite. Analog ist b_{10} die extrapolierte Halbwertsbreite bei $11t_0$. Die Gültigkeit dieser Theorie ist von zwei Nebenbedingungen abhängig. Zunächst ist die genaue Kenntnis der Totzeit für die Berechnung der realen Kenngrößen erforderlich. Da kein allgemein anwendbares Verfahren zur Bestimmung der Totzeit existiert, ist diese Forderung nur innerhalb einer gewissen Toleranz zu erfüllen. Die zweite Nebenbedingung ist die lineare Abhängigkeit der Halbwertsbreite von der Retentionszeit. DieseVoraussetzung ist nur in homologen Reihen streng erfüllt und bildet deshalb einen Ansatzpunkt für Kritik (59).

Für die Analyse eines Multikomponentengemisches ist neben dem Trennvermögen der Säule auch die Auflösung R_s mit

$$R_s = \frac{t''_R - t'_R}{b''_{0,5} + b'_{0,5}} \qquad (4.4)$$

t'_R ; $b'_{0,5}$ = Retentionsdaten der Komponente 1

t''_R ; $b''_{0,5}$ = Retentionsdaten der Komponente 2

ein geeignetes Kriterium für die Beurteilung einer Trennsäule.

In Tabelle 4.7 sind die Kenngrößen für zwei nach der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Füllmethode

hergestellten Trennsäulen wiedergegeben.
Es wurden 25 µl eines Gemisches dosiert, das die Komponenten
MC ($c = 2{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol/l), DDD ($c = 2{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol/l)
DDT ($c = 2{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol/l), DDE ($c = 3{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol/l)
enthielt.
Es gelingt mit beiden Säulen unter isokratischen Bedingungen nicht, sämtliche Peaks vollständig aufzutrennen. Bei höheren als den hier verwendeten Konzentrationen finden zum Teil erhebliche Überlappungen statt. Es empfiehlt sich nicht, den Wassergehalt des Eluenten zu erhöhen, da hieraus sehr hohe Analysenzeiten resultieren. Dies verdeutlicht auch der Kapazitätsfaktor

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad (4.5)$$

der das Verhältnis der Aufenthaltszeit in der stationären Phase zu der in der mobilen Phase wiedergibt. Die zuletzt eluierten Peaks werden zusätzlich stark verbreitert, so daß die Integrationsgrenzen mit größerer Unsicherheit bestimmt werden.
Bei Trennsäulen die sich längere Zeit im Gebrauch befinden, verschlechtern sich die Trennleistungen. Es wurde beobachtet, daß die verwendeten RP-18 Säulen schneller altern als die ebenfalls benutzten RP-8-Säulen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Bindung des voluminösen Octadecylgerüstes an das Trägermaterial stärker belastet ist als die der kleineren Oktylgruppe.
Für den Routinebetrieb empfiehlt sich deshalb der Einsatz des robusteren RP-8-Materials.
Ausgehend von einer erweiterten Theorie der Böden

Säule	Substanz	t_R (min)	$b_{0,5}$ (min)	n	h (10^{-3}cm)	k′	n_{real}	h_{real} (10^{-3}cm)
1	MC	5,68	0,25	2862	8,73	3,30	3224	7,75
	DDD	6,83	0,32	2526	9,90	4,17		
	DDT	10,45	0,46	2862	8,74	6,92	$R_{MC,DDD}$	$R_{DDD,DDE}$
	DDE	11,56	0,50	2964	8,43	7,76	2,02	2,26
							n_{real}	h_{real} (10^{-3}cm)
2	MC	5,48	0,23	3148	7,94	3,72	3773	6,63
	DDD	6,48	0,28	2970	8,42	4,59		
	DDT	11,25	0,44	3625	6,90	8,70	$R_{MC,DDD}$	$R_{DDD,DDE}$
	DDE	14,32	0,58	3380	7,40	11,34	1,96	3,01

Tab. 4.7 Charakterisierung der Trennsäulen 1 und 2
Trennsäule 1: Füllmaterial: RP-8 7µm, $\dot{V}_o$ = 1,80 ml/min
Eluent: 78% CH_3OH - 22% H_2O, t_o = 1,32 min
Trennsäule 2: Füllmaterial: RP-18 10µm, $\dot{V}_o$ = 1,80 ml/min
Eluent: 84% CH_3OH - 16% H_2O, t_o = 1,15 min

geben van Deemter, Zuiderweg und Klinkenberg (60) eine Beziehung an, die Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Höhe einer theoretischen Trennstufe und den kinetischen Erscheinungen gestattet.
In übersichtlicher Form kann diese Gleichung als

$$h = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \qquad (4.6)$$

dargestellt werden (61).

h = theoretische Trennstufenhöhe
u = Lineargeschwindigkeit
A = Eddy-Diffusions-Term
B = Longitudinaldiffusions-Term
C = Term der Gleichgewichtseinstellung zwischen den Phasen

Versuchsbedingungen bei der Aufnahme der Meßpunkte zu Tabelle 4.8:
Stationäre Phase: RP-8 7µm
Eluens : 78% CH_3OH - 22% H_2O
Substanz : Methoxychlor
Konzentration : $5{,}66 \cdot 10^{-4}$ mol/l
Es handelte sich um eine Säule, die schon einige Zeit in Gebrauch war; es ist eine Verschlechterung des Trennvermögens gegenüber einer frisch gepackten Trennsäule (vgl. Tab. 4.7) festzustellen. Die theoretischen Trennstufenhöhen wurden durch Vermessen der auf dem Kompensationsschreiber registrierten Chromatogramme ermittelt. Hieraus resultiert, wie schon früher festgestellt wurde (62), eine relativ große Streuung der Meßpunkte.

P (bar)	t_0 (min)	u (cm/min)	h (10^{-2}cm)
15	17,80	1,40	0,98
30	8,65	2,89	0,98
70	4,40	5,68	1,15
100	3,35	7,46	1,28
120	2,75	9,09	1,38
150	2,30	10,87	1,42
170	2,00	12,50	1,46
195	1,70	14,71	1,48
220	1,55	16,13	1,52

Tab. 4.8 Berechnung der Höhe der theoretischen Böden für unterschiedliche Linear-geschwindigkeiten des Eluenten

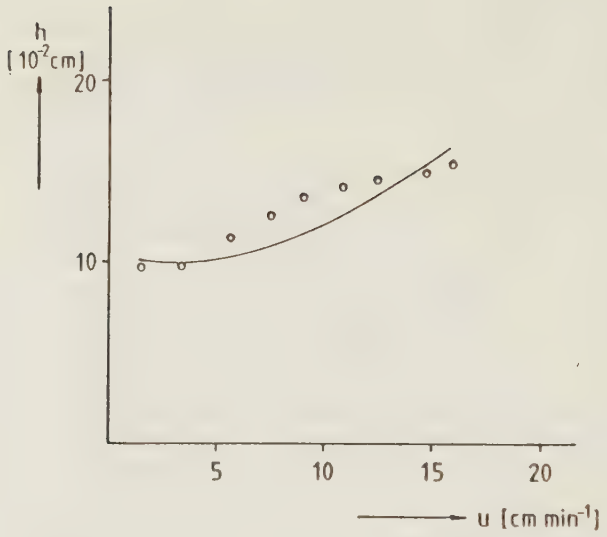


Abb. 4.6 Graphische Auftragung der van Deemter-Beziehung für die Werte der Tab. 4.8

Das Minimum der van Deemter-Gleichung (Abb. 4.6) liegt bei relativ geringen Lineargeschwindigkeiten des Eluenten. In der Praxis ist es im Interesse vertretbarer Analysenzeiten meist günstiger, bei höherer Lineargeschwindigkeit und geringfügig schlechterem Trennvermögen zu arbeiten.

4.2.3 Die Bestimmung der Totzeit in Reversed-Phase-Systemen

Wie schon im vorausgehenden Abschnitt angedeutet, ist für die quantitative Beschreibung der Trennmechanismen die genaue Kenntnis der Totzeit erforderlich. Die Totzeit ist als die Aufenthaltszeit einer nichtretardierten Substanz (63) in der Trennsäule definiert. Im Falle der Adsorptionschromatographie wird bei Verwendung eines aliphatischen Kohlenwasserstoffs als mobile Phase oft Tetrachlorethen, Tetrachlorkohlenstoff oder ein niederes Homologes des Eluenten zur Bestimmung der Totzeit dosiert. Wird ein UV-Gerät zur Detektion benutzt, tritt jedoch eine erhebliche Schwierigkeit auf: Die dosierte Substanz muß eine ausreichende Absorptionsdifferenz zum Eluenten aufweisen. Klukas (47) schlägt zur Totzeitbestimmung deshalb die Dosierung von Luft oder Sauerstoff und die Detektion bei Wellenlängen unter 240 nm vor. Die beobachtete Absorption ist auf den $n\text{-}\sigma^*$-Übergang des O_2-Moleküls zurückzuführen, der im Bereich von 200 nm liegt. Dieses Verfahren setzt eine gründliche Entgasung des Eluenten voraus. Zur Richtigkeit der erhaltenen Werte bemerkt Klukas, daß bei einer ungünstigen Porengrößenverteilung der stationären Phase, den Sauerstoffmolekülen ein größeres Diffusionsvolumen zur Verfügung steht als den Lösungsmittelmolekülen. Auf diese Weise können zu große Totzeiten erhalten werden. Halász (64) gibt für poröse Materialien folgende Formel zur Berechnung der Totzeit an

$$t_0 = \frac{L \cdot r_i^2 \cdot \pi \cdot \varepsilon}{\dot{V}_o} \qquad (4.7)$$

mit

L = Säulenlänge

r_i = Radius der Säule

ε = Porosität

$\dot{V}_o$ = Strömungsgeschwinidgkeit

Die Porosität beträgt zwischen $\varepsilon = 0{,}84$ bei vollständig porösen Teilchen und $\varepsilon = 0{,}42$ bei undurchlässigen Teilchen. Für Reversed-Phase-Material liegt ε in Abhängigkeit vom Belegungsgrad der Trägeroberfläche und von der Packungsdichte zwischen $\varepsilon = 0{,}75$ und $\varepsilon = 0{,}60$ (63).

Bei chemisch gebundenen stationären Phasen und Wasser-Methanol-Gemischen als Eluent gestaltet sich die Totzeitbestimmung problematisch. Ein Sauerstoffsignal ist oft nicht zu beobachten. Grund hierfür ist zunächst die gute Löslichkeit von Luft in wässrigen Lösungen. Durch den gelösten Sauerstoff weist der Eluent bei Wellenlängen im Bereich von 200 nm bereits eine große Absorption auf. Der Vorschlag von Meyer (65), das relativ polare Aceton zur Bestimmung der Totzeit zu verwenden, muß im Hinblick auf die Lebensdauer der Trennsäule verworfen werden. Aceton führt nämlich durch Ablösung der organischen Belegung zu einer raschen Zerstörung des Säulenmaterials. Lösungen von KJ und $NaNO_3$ im Eluenten wurden experimentell auf ihre Eignung zur Totzeitbestimmung untersucht. Die Detektion des Eluats geschah im Wellenlängenbereich zwischen 210 nm und 230 nm. Für beide Salze wurden identische Aufenthaltszeiten in der Trennsäule ermittelt. Bei einem Vergleich

dieser Werte mit der nach Gleichung 4.7 erwarteten Totzeit mußte festgestellt werden, daß diese Salze offensichtlich Ausschlußeffekten unterliegen, da sie nur bei einer angenommenen Porosität des Säulenmaterials von $\varepsilon = 0{,}42$ mit der erwarteten Totzeit identisch sind.
In einem weiteren Experiment wurde jeweils eine reine Komponente des Eluenten dosiert. Da die Trennsäule mit dem Eluenten überlastet ist, können keine Retentionseffekte sondern lediglich Platzwechselvorgänge wirksam werden. Zur Detektion konnte das aus den Brechzahldifferenzen resultierende scheinbare Absorptionssignal benutzt werden. Sowohl für die Dosierung von Methanol als auch bei der Verwendung von Wasser konnten identische Signallagen ermittelt werden. Die Porosität für diese Signale lag bei $\varepsilon = 0{,}60$. Diese letzte Methode ist also zur Ermittlung der Totzeit in Reversed-Phase-Systemen geeignet. Sie bietet den Vorteil, daß keine Vorarbeiten wie z.B. eine vorangehende gründliche Entgasung des Eluenten erforderlich sind. Schließlich führt diese Methode auch nicht zu einer, bei anderen Methoden beobachteten, vorzeitigen Alterung der stationären Phase.

4.2.4 Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten unter isokratischen Bedingungen

Es wurde ein Substanzgemisch aus den Komponenten DDD ($c = 2{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und DDT ($c = 2{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol/l) auf einer RP-8 7µm-Säule chromatographiert. Der Eluent aus 79% Methanol und 21% Wasser wurde mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1,25 ml/min durch die Säule geleitet. Die Detektion wurde bei 235 nm vorgenommen. Die Meßergebnisse aus 9 Chromatogrammen sind in Tabelle 4.9 zusammengefaßt:

Substanz	DDD	DDT
$\bar{t}_R$ (min)	7,29	10,82
s (min)	0,078	0,162
s_{rel} (%)	1,07	1,50

Tab. 4.9 Mittelwerte der Retentionszeiten für die Substanzen DDD und DDT sowie deren Streuung, bestimmt aus 9 Chromatogrammen

Bei einem Vergleich der Variationskoeffizienten aus Tabelle 4.9 mit der Streuung der Durchflußgeschwindigkeit (vgl. 4.1.1) wird deutlich, daß die Streuung der Retentionszeiten im wesentlichen durch die kinetischen Effekte in der Trennsäule bestimmt wird. Durch die Verwendung konstanter fördernder Pumpen kann deshalb nur noch eine geringere Verbesserung in der Reproduzierbarkeit der Retentionsdaten erreicht werden.

4.2.5 Der Einfluß der Trennsäulentemperatur auf die Trennleistung

Die Viskosität der verwendeten Lösungsmittel nimmt mit steigender Temperatur ab. Bei einem durch die Apparatur begrenzten Maximaldruck wird durch eine Erhöhung der Säulentemperatur die mögliche Strömungsgeschwindigkeit gesteigert. Da die kinetischen Effekte in der Trennsäule ebenfalls stark temperaturabhängig sind, ist eine Untersuchung für eine nachfolgende Optimierung notwendig. Die Ergebnisse der Tabelle 4.10 sind mit Ausnahme der Strömungsgeschwindigkeit unter zuvor (4.2.4) beschriebenen Bedingungen erzielt worden.
Die Strömungsgeschwindigkeit wurde davon abweichend auf 1,00 ml/min bei einer Eluentenzusammensetzung aus 80% Methanol und 20% Wasser konstant gehalten. Da der Säulenofen nur über eine regelbare Heizeinrichtung verfügt, können lediglich Temperaturen gewählt werden, die oberhalb der Raumtemperatur liegen. Neben dieser unteren Begrenzung des Meßbereichs bildet die Siedetemperatur des Eluenten die obere Schranke.
Mit steigender Temperatur nehmen, wie man aus Tabelle 4.10 ersehen kann, die Retentionszeiten und damit die Analysenzeiten ab. Die Auflösung der beobachteten Substanzen nimmt in der gleichen Richtung ab. Es ist folglich für ein gegebenes Analysenproblem ein Kompromiß zwischen den Parametern Analysenzeit und Auflösung zu suchen.

	Trennsäulentemperatur (°C)					
	33		40		50	
Substanz	t_R (min)	$b_{0,5}$ (min)	t_R (min)	$b_{0,5}$ (min)	t_R (min)	$b_{0,5}$ (min)
DDD	8,32	0,27	6,96	0,22	6,23	0,22
DDT	12,87	0,41	10,21	0,30	8,92	0,27
$R_{DDD,DDT}$	6,56		6,25		5,49	

Tab. 4.10 Einfluß der Trennsäulentemperatur auf die kinetischen Parameter

4.2.6 Der Einfluß des im Eluenten gelösten Sauerstoffs auf das Meßsignal

Die meisten Hersteller von HPLC-Geräten empfehlen eine Entgasung des Eluenten. Hierdurch soll eine Gasblasenbildung in den Einlaßventilen und in der Detektorküvette vermieden werden. Die Gasblasenbildung in den Einlaßventilen ist auf einen geringen Unterdruck in der Ansaugphase der Pumpe und einer damit verbundenen schlechteren Löslichkeit der im Eluenten enthaltenen Gase zurückzuführen; in der Detektorküvette kommt es zu einer Entspannung der zuvor komprimierten Flüssigkeit und damit möglicherweise zu einer Gasbläschenbildung. Es werden verschiedene Methoden zur Entgasung von Flüssigkeiten verwendet. Die gebräuchlichsten sind die Vakuumentgasung, das

Erhitzen von wässrigen Eluenten und die Ultraschallentgasung. Eine von Spatz (66) beschriebene Heliumentgasung erscheint nicht ratsam, da hier nicht nur eine Substitution der gelösten Luft durch Helium sondern auch eine Gassättigung eintritt, die dann zu den beschriebenen Erscheinungen führt.
Im Versuch erwies sich die Ultraschallentgasung mit Unterstützung eines Wasserstrahlvakuums im Falle von wässrigen Eluenten als leistungsfähig. Während des Betriebs des Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen löst der im Vorratsgefäß befindliche Eluent wieder kontinuierlich einen Teil des überstehenden Gases. Die Konzentration des Gases im Eluenten ist also zeitabhängig. Dieser Effekt kann bei Wellenlängen unter 240 nm durch die Absorption des Sauerstoffs Auswirkungen auf die Messungen zeigen.
Zur Klärung dieser Frage wurden die Meßreihen 4.6 und 4.7 aufgenommen. Es wurde jeweils 5 mal die Peakfläche einer dosierten Methoxychlorlösung ($c = 1{,}13 \cdot 10^{-4}$ mol/l) nach Retention in einer Trennsäule (RP-8 7µm) mit einem Integrator* bestimmt. In der ersten Meßreihe war zuvor der Eluent (80% Methanol - 20% Wasser) sorgfältig mittels Ultraschall und Wasserstrahlvakuum entgast worden. In der zweiten Meßreihe war die Flüssigkeit durch längeres Einleiten von Sauerstoff gesättigt. Es wurde Sauerstoff verwendet, um den erwarteten Effekt gegenüber Luft zu verstärken. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 aufgelistet. Die beiden Meßreihen liefern identische Ergebnisse für die Peakflächen. Die

* Typ HP 3380 A, Hewlett Packard, Böblingen

Meßreihe	4.6	4.7
$\bar{A}_{rel}$	1,00	0,98
s	0,013	0,013
s_{rel} (%)	1,3	1,3

Tab. 4.11 Integration der Peakflächen von 5 Chromatogrammen
4.6) bei entgastem Eluenten
4.7) bei Sättigung des Eluenten mit O_2

Absorption des Eluenten war in der Meßreihe 4.7 um 0,093 gegenüber der Meßreihe 4.6 erhöht. Um die erwartete Drift der Grundlinie (vgl. 4.1.5) bei digital erfaßten Chromatogrammen auszugleichen, wurde in der Software eine zusätzliche Untergrundkompensation berücksichtigt (vgl. Anhang Programm EIPO und MECO).

5. Gradienten-Elution

In der Flüssigkeits-Chromatographie ist die Wahl des Eluenten von ausschlaggebender Bedeutung auf die Trennergebnisse. Unter isokratischen Bedingungen ist es oft unmöglich, für alle Komponenten eines komplexen Substanzgemisches die notwendige Auflösung zu erreichen. Bei einer Optimierung des Eluenten auf die Auflösung der zuerst eluierten Substanz haben die nachfolgenden Komponenten oft sehr lange Retentionszeiten. Die Kapazitätsfaktoren für diese zuletzt eluierten Peaks sind oft größer als $k' = 10$.
Die Gradienten-Elution ermöglicht die Verkürzung der Analysendauer durch eine sukzessive Optimierung des Eluenten für eine Reihe von Komponenten. Die relativ scharfen Peakformen, die bei dieser Arbeitsmethode beobachtet werden, wirken sich zudem positiv auf die chromatographische Auflösung aus.
Der Einfluß der Eluentenzusammensetzung auf das Detektorsignal hat allerdings nachteilige Auswirkungen auf den Verlauf der Grundlinie der Chromatogramme. Die Verwendung einer Referenzsäule und eines Referenzdetektors zur Kompensation dieses Effektes ist nicht empfehlenswert. Zunächst spricht der hohe apparative Aufwand gegen diese Methode. Zusätzlich ist es überaus schwierig, zwei identische Trennsäulen zu packen. Durch unterschiedliche Betriebsbedingungen der Arbeits- und Referenzsäule werden sich zudem nach kurzem Gebrauch erhebliche Unterschiede im Verhalten der Säulen herausbilden.
Bei der rechnergestützten Meßwerterfassung ist es möglich, ein Referenzchromatogramm aufzunehmen und hiermit eine Untergrundsubtraktion durchzuführen.

Im folgenden sollen einige Probleme, die bei der Gradienten-Elution auftreten, geklärt werden.

5.1 Die Durchflußkonstanz bei der Gradienten-Elution

Bei der Gradienten-Elution wird der Eluent durch die Addition der Fördermengen zweier Hochdruckpumpen hergestellt (vgl. 3.1.1). Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, daß die beiden Pumpen identisch arbeiten. Die Hubvolumina sämtlicher Kolben können Unterschiede aufweisen, weil zur Minimierung der Restpulsation der Kolbenhub der Pumpen individuell begrenzt wurde. Bei der Gradienten-Elution ändert sich außerdem die Viskosität und damit der Strömungswiderstand der Trennsäule und der Druck in der Apparatur. Erfahrungsgemäß sind die Ventilsteuerzeiten der verwendeten Kugelventile abhängig vom Druck im System. Bei der Methode der Gradienten-Elution werden sich Unterschiede in den Eigenschaften der Ventile auf die Förderung auswirken.
Aus den geschilderten Gründen war es für weitere Arbeiten erforderlich, die Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.1 durch die Untersuchung der Durchflußkonstanz bei der Gradientenelution zu ergänzen.
Der Versuchsaufbau entsprach dem aus Abschnitt 4.1.1. Es wurde das in Abbildung 5.1 wiedergegebene Eluentenprogramm am Gradientensteuergerät eingestellt. In jedem der 5 Segmente wurde eine Messung der Strömungsgeschwindigkeit vorgenommen.
Tabelle 5.1 gibt die Ergebnisse der Meßreihe wieder.

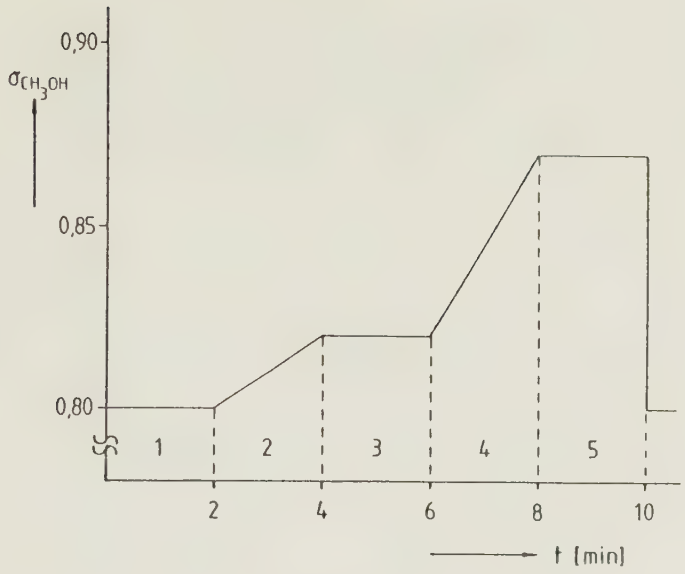


Abb. 5.1 Eluentenprogramm für ein Methanol-Wasser-Gemisch bestehend aus 5 Segmenten mit nachfolgender Rückkehr zur Ausgangszusammensetzung

Segment	1	2	3	4	5
$\bar{\dot{V}}_o$ (ml/min)	1,665	1,659	1,657	1,667	1,663
s (10^{-3} ml/min)	4,15	3,89	4,09	3,74	3,99
s_{rel} (%)	0,25	0,23	0,25	0,22	0,24

Tab. 5.1 Mittelwerte der Strömungsgeschwingigkeit bestimmt aus jeweils 3 Messungen

Die gemessenen Strömungsgeschwindigkeiten sind im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich. Diese Aussage wird durch den schon beschriebenen F-Test bestätigt. Die Streuung der Meßwerte entspricht der in Abschnitt 4.1.1 angegebenen, unter isokratischen Bedingungen gemessenen Durchflußkonstanz.

5.2 Das Totvolumen im Gradientensystem

Die Mischung des Eluenten geschieht im Druckaufnehmerblock der Pumpe B (s. Abb. 3.2). Bei einer Änderung der Eluentenzusammensetzung ist das im System befindliche Flüssigkeitsvolumen zwischen dem Druckaufnehmerblock und dem Säulenanfang als Totvolumen zu betrachten. Zum Totvolumen tragen die Verbindungskapillaren, die Eluentenmischkammer des Gradientensteuergerätes und das Probendosiersystem bei.
Das Totvolumen des Gradientensystems wurde experimentell ermittelt. Hierzu wurde der Eluent, ein Methanol-Wasser-Gemisch, hinter dem Probendosiersystem mit Hilfe einer Kapillare in die Küvette des Spektralphotometers geleitet. Das Innenvolumen sämtlicher Verbindungskapillaren betrug ca. $75{,}0 \cdot 10^{-3}$ ml. Das Probendosiersystem befand sich für die Messung in der Dosierstellung, so daß die Probenschleife (V_D = 25 µl/vgl. 4.1.3) durchflossen wurde. Der Verlauf des Lösungsmittelgradienten und die resultierende Signaländerung sind in Abbildung 5.2 wiedergegeben. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 1,00 ml/min.
Aus der Abbildung ist zu erkennen, daß die Absorptionsänderungen dem Verlauf des Gradientenprogramms folgen.

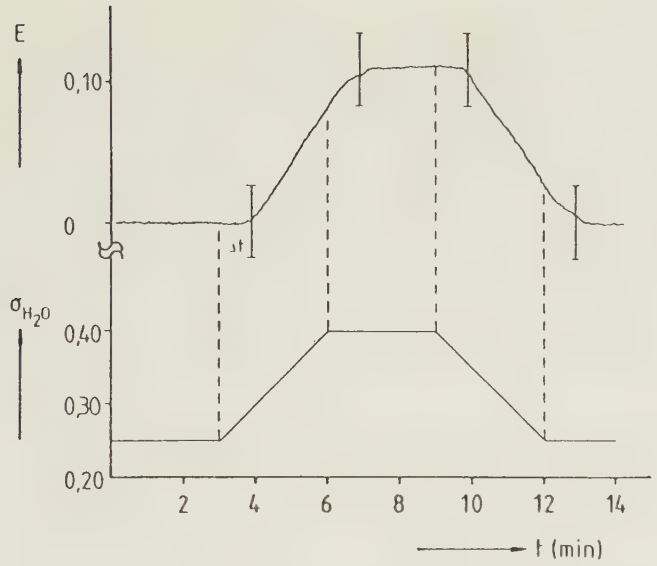


Abb. 5.2 Eluentenprogramm für ein Methanol-Wasser-Gemisch und resultierendes Chromatogramm bei 210 nm; ohne Trennsäule, analog registriert;
$\dot{V}_o$ = 1,00 ml/min

Die Knickpunkte des Gradientenprogramms werden jedoch im Chromatogramm, bedingt durch Totvolumina, gerundet wiedergegeben. Bei einer Extrapolation der linearen Bereiche liegen die Schnittstellen dieser Geraden um Δt = 0,8 min gegenüber den entsprechenden Punkten des Gradientenprogramms verschoben. Diese Zeitverschiebung entspricht einem Totvolumen von V_T = 0,8 ml.
Da die Volumina der Verbindungskapillaren und des

Probendosiersystems (vgl. 4.1.3) um zwei Zehnerpotenzen kleiner sind als der ermittelte Wert, ist das ermittelte Totvolumen folglich im wesentlichen auf den Beitrag der Eluentenmischkammer des Gradientensteuergerätes zurückzuführen.
Eine konstruktive Verbesserung des Gerätes in Hinblick auf eine verzögerungsfreie Wirkung des Gradienten kann durch eine Verkleinerung dieses Bauteils erfolgen.

5.3 Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit unter den Bedingungen der Gradienten-Elution

Reversed-Phase-Material wird durch die Reaktion von Hydroxylgruppen des Trägermaterials Kieselgel mit entsprechenden Alkylchlorsilanen erhalten. Die Konzentration der Hydroxylgruppen an der Oberfläche des Trägermaterials liegt bei 8 bis 9 $\mu mol/m^2$; die Oberflächenkonzentration der organischen Komponente beträgt nach erfolgter Reaktion jedoch nur 2 bis 4 $\mu mol/m^2$ (67,68). Der Grund hierfür ist der im Verhältnis zu den Hydroxylgruppen große Platzbedarf der Alkylgruppen. Die verbleibenden Hydroxylgruppen üben durch ihre unpolaren Eigenschaften noch einen Einfluß auf das Verhalten der stationären Phase aus. Dieser Einfluß kann durch einen weiteren Umsatz mit Trimethylchlorsilan (69) vermindert,aber nicht eliminiert werden. Bei der Verwendung von Wasser als Komponente des Eluenten macht sich die unvollständige Reaktion der Kieselgeloberfläche einerseits durch die Physisorption dieser Komponente vornehmlich an den freien Hydroxylgruppen, zum anderen aber auch durch Chemisorption, bedingt durch die Hydrolyse von Si-O-Si-Bindungen der Oberfläche,

bemerkbar (70,71).
Die gute Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten unter isokratischen Bedingungen (vgl. 4.2.4) beweist, daß das Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption für die Dauer der Messungen keinen starken Schwankungen unterworfen ist.
Es mußte experimentell bestimmt werden, ob sich die beschriebenen Effekte bei einer Änderung der Eluentenzusammensetzung in Form eines Gradientenprogramms störend auf die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten

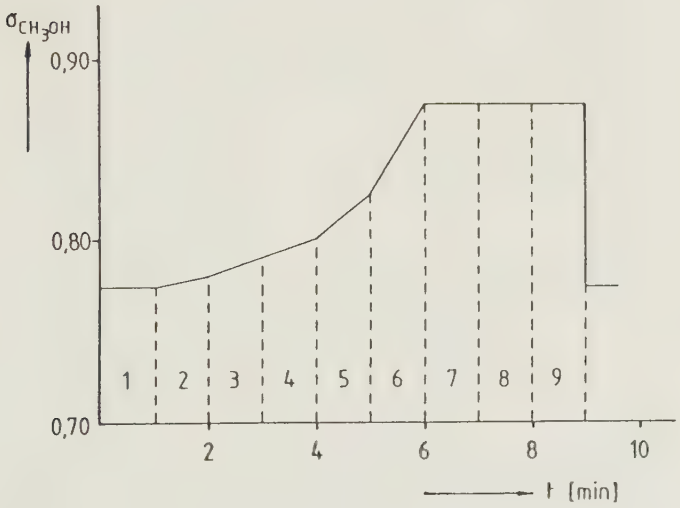


Abb. 5.3 Eluentenprogramm für ein Methanol-Wasser-Gemisch bestehend aus 9 Segmenten mit nachfolgender Rückkehr zur Ausgangszusammensetzung, $\dot{V}_o$ = 1,20 ml/min

auswirkt.
Im Versuch wurde die bereits in Abschnitt 4.2.4 verwendete Probe mit den Komponenten DDD und DDT 13 mal auf einer RP-8 7µm-Säule chromatographiert. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 1,20 ml/min. Bei der Dosierung wurde mit Hilfe des am Dosiersystem angebrachten Mikroschalters (vgl. 3.1.2) das in Abbildung 5.3 wiedergegebene Gradientenprogramm gestartet. Die Chromatogramme wurden mit dem Kompensationsschreiber registriert und graphisch ausgewertet. In Tabelle 5.2 sind die Ergebnisse der Meßreihe zusammengefaßt.

Substanz	DDD	DDT
$\bar{t}_R$ (min)	7,29	9,07
s (min)	0,082	0,085
s_{rel} (%)	1,13	0,94

Tab. 5.2 Mittelwerte und Streuungen der Retentionszeiten aus 13 Chromatogrammen; das zugehörige Gradientenprogramm ist in Abb. 5.3 wiedergegeben

Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten wird bei der Gradienten-Elution gegenüber der isokratischen Arbeitsweise ($s_{rel} \leq 1{,}50\%$ / vgl. 4.2.4) nicht verschlechtert.

5.4 Der Einfluß der Eluentenpolarität auf die Retentionszeit

Wie im vorangehenden Abschnitt erläutert, kann die Oberfläche des verwendeten Reversed-Phase-Säulenmaterials nicht als homogen betrachten werden. Die Oberflächeneigenschaften werden sowohl von den chemisch gebundenen unpolaren Kohlenwasserstoffketten als auch von den polaren Hydroxylgruppen bestimmt. Aus diesen Gründen ist eine Beschreibung der zur Retention führenden Mechanismen mit Schwierigkeiten verbunden (73). Es existieren Modelle, die das Phänomen durch Adsorptionsprozesse (72) oder auch durch Verteilung zwischen der stationären und der mobilen Phase (74,75) erklären. Da beide Betrachtungsweisen Grenzmodelle darstellen, wird eine Kombination beider Modelle (76,77) die konträren Eigenschaften der stationären Phase wahrscheinlich physikalisch richtiger wiedergeben.
Da die Modellrechnung auf die hier angeschnittenen Schwierigkeiten stößt, erscheint es sinnvoll, die Abhängigkeit der Retentionszeit von der Eluentenpolarität bei einer vorgegebenen Trennsäule empirisch zu ermitteln.
Im Versuch wurde eine Trennsäule mit RP-8 7µm-Material verwendet. Um apparative Einflüsse auf die Zusammensetzung der verwendeten Eluenten auszuschließen, wurden die in Tabelle 5.3 aufgeführten Lösungen extern hergestellt. Für die Förderung des Eluenten wurde ausschließlich Pumpe B benutzt. Zur Änderung der Eluentenzusammensetzung mußte das Vorratsgefäß gewechselt werden.

σ_{CH_3OH}	$1/\sqrt{\sigma_{CH_3OH}}$	MC		DDD		DDT		DDE	
		t_R (min)	ln k'	t_R (min)	ln k'	t_R (min)	ln k'	t_R (min)	ln k'
1,000	1,000	2,55	-1,84	2,55	-1,84	2,75	-1,39	2,75	-1,39
0,950	1,026	2,80	-1,30	2,80	-1,30	3,05	-0,95	3,20	-0,79
0,920	1,043	3,00	-1,01	3,00	-1,01	3,35	-0,65	3,60	-0,45
0,900	1,054	3,15	-0,84	3,15	-0,84	3,75	-0,35	4,05	-0,17
0,880	1,066	3,40	-0,61	3,50	-0,53	4,20	-0,10	4,60	0,09
0,850	1,085	4,00	-0,20	4,25	-0,07	5,30	0,34	5,80	0,49
0,830	1,098	4,30	-0,05	4,65	0,11	6,50	0,56	6,70	0,72
0,800	1,118	5,50	0,41	6,20	0,60	8,70	1,08	9,80	1,24
0,780	1,132	5,90	0,52	6,75	0,73	9,60	1,21	10,70	1,35
0,750	1,155	7,70	0,92	9,20	1,16	13,90	1,67	15,60	1,81

Tab. 5.3 Meßwerte zur Bestimmung des Einflusses der Eluentenzusammensetzung auf die Retentionszeit ($\dot{V}_o$ = 1,20 ml/min, t_0 = konst. = 2,20 min, V_D = 25 µl)
Dosierte Lösungen: MC ($c = 2{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol/l); DDD ($c = 2{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol/l); DDT ($c = 2{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol/l); DDE ($c = 3{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol/l)

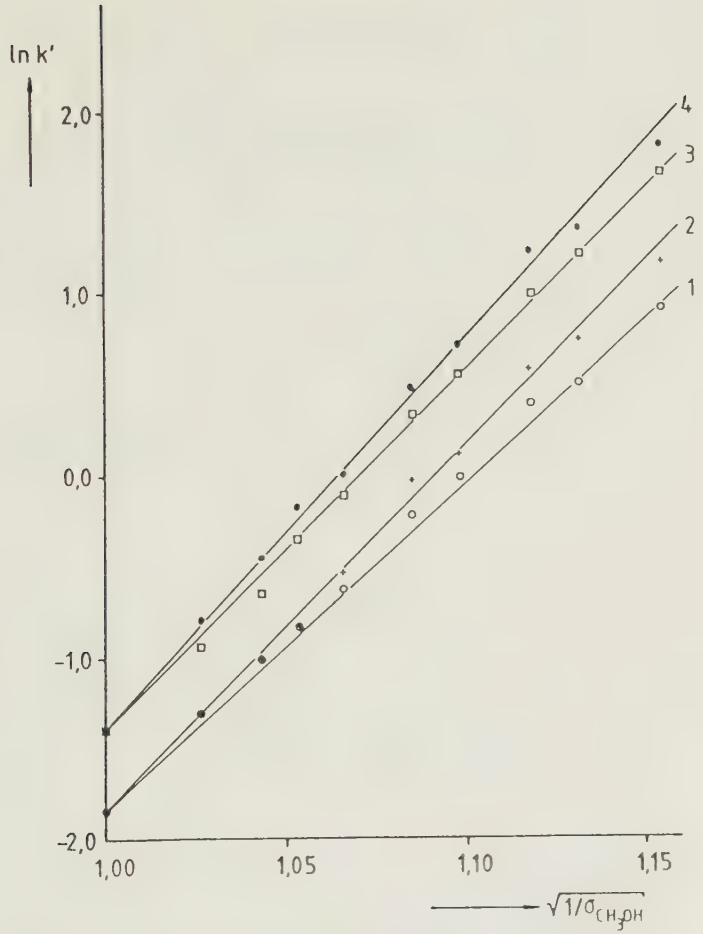


Abb. 5.4 Graphische Auftragung der ln k'-Werte als Funktion von $\sqrt{1/\sigma_{CH_3OH}}$
1 = Methoxychlor; 2 = DDD;
3 = DDT; 4 = DDE

Die Bestimmung der Meßwerte geschah durch Vermessen der mit dem Kompensationsschreiber aufgezeichneten Chromatogramme. Um die Konstanz der Strömungsgeschwindigkeit zu kontrollieren, wurde aus jedem Chromatogramm die Totzeit ermittelt. Die Totzeit blieb in der gesamten Meßreihe mit t_0 = 2,20 min konstant. Die Ergebnisse der Messungen sind der Tabelle 5.3 zu entnehmen. In Tabelle 5.4 ist eine Beschreibung der Meßwerte mit Hilfe von Regressionsgeraden vorgenommen worden.

	MC	DDD	DDT	DDE
m	17,83	19,72	20,41	20,75
c	-19,62	-21,56	-21,85	-21,08
r	0,998	0,998	0,998	0,998

Tab. 5.4 Parameter der Regressionsgeraden mit Korrelationskoeffizienten r berechnet nach $\ln k' = m/\sqrt{\sigma_{CH_3OH}} + c$ für die Meßwerte der Tab. 5.3

Die Meßwerte lassen sich durch eine Regressionsgerade nach

$$\ln k' = m/\sqrt{\sigma_{CH_3OH}} + c \qquad (5.1)$$

beschreiben. Die graphische Auftragung der Meßwerte ist in Abbildung 5.4 wiedergegeben.
Da der Kapazitätsfaktor als

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

definiert ist, folgt nach Einsetzen dieser Beziehung in Gleichung 5.1 und anschließender Potenzierung

$$\frac{t_R - t_0}{t_0} = \exp\left(m/\sqrt{\sigma_{CH_3OH}} + c\right)$$

bzw. durch Auflösung nach t_R

$$t_R = t_0 + t_0 \cdot \exp\left(m/\sqrt{\sigma_{CH_3OH}} + c\right) \qquad (5.2)$$

Da die Lineargeschwindigkeit u in einer Trennsäule der Länge L durch

$$u = L/t \qquad (5.3)$$

mit

t = Aufenthaltszeit in der Trennsäule

gegeben ist, ergibt sich durch Kombination der Gleichungen (5.2) und (5.3)

$$u = u_0/\left(1 + \exp\left(m/\sqrt{\sigma_{CH_3OH}} + c\right)\right) \qquad (5.4)$$

mit

$$u_0 = L/t_0$$

Mit Hilfe von Gleichung 5.4 läßt sich die Lineargeschwindigkeit einer Probensubstanz berechnen. Die Lineargeschwindigkeit der Probe ist somit erwartungsgemäß von der Lineargeschwindigkeit des Eluenten und von substanzspezifischen Parametern abhängig.

5.5 Möglichkeiten zur Bestimmung des Gradientenprogramms

Basierend auf den Ergebnissen des vorhergehenden Abschnitts konnte ein Modell erarbeitet werden, das für ein mehrstufiges Gradientenprogramm eine Beschreibung der Bewegung von Probesubstanzen in der Trennsäule gestattet. Die Entwicklung dieses Modells war erforderlich geworden, weil es sich gezeigt hatte, daß bestehende Modelle von Gesetzmäßigkeiten ausgehen, die für die behandelten Substanzen nicht zutreffen. So kann die Annahme, daß das Volumen der lösenden Komponente des Eluenten im Retentionsvolumen konstant ist (73,78) nicht mit den Meßwerten der Tabelle 5.3 in Einklang gebracht werden. Modelle, die nur geringe Änderungen der Eluentenzusammensetzung gestatten (79), entsprechen nicht den apparativen Gegebenheiten und sind aus diesem Grunde nicht geeignet.
Das entwickelte Modell stellt eine Näherungslösung dar, die sukzessive für kurze Zeitabschnitte eine Weg-Zeit-Beziehung für die Wanderung einer Probesubstanz in einer Trennsäule unter Einfluß eines Eluentenprogramms angibt.
In der Zeit t_s legt die Eluentenfront eine virtuelle Weglänge

$$\Delta s = u_o \cdot t_s \qquad (5.5)$$

in der Trennsäule zurück. Die Verweildauer t einer Probesubstanz in diesem Segment ist die Zeit, in der der Wegunterschied zwischen der Substanz s_p und der Eluentenfront s_E der virtuellen Ausdehnung des Eluentensegments Δs entspricht.

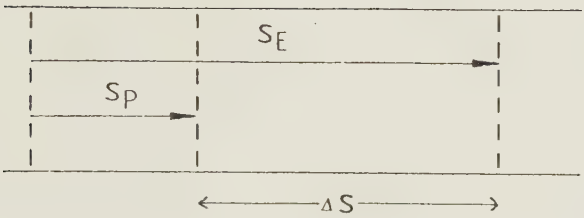


Abb. 5.5 In der Zeit t vom Eluenten (s_E) und von der Probe (s_P) zurückgelegte Wege

Es gilt also

$$\Delta s = s_E - s_P \tag{5.6}$$

Durch Einsetzen der Weg-Zeit-Beziehung folgt hieraus

$$\Delta s = u_o \cdot t - \int u \, dt \tag{5.7}$$

Für kleine dt kann die Weg-Zeit-Beziehung durch eine gleichmäßig beschleunigte Bewegung angenähert werden.

$$\int_{t_1}^{t_2} u \, dt = \lim_{t \to 0} \left(\frac{u_2 - u_1}{2} \cdot t + u_1 \cdot t \right) \tag{5.8}$$

Unter dieser Voraussetzung gilt

$$\Delta s = u_o \cdot t - \left(u_1 \cdot t + \frac{u_2 - u_1}{2} \cdot t \right)$$

bzw.

$$t = \frac{\Delta s}{\left(u_o - \frac{u_1 + u_2}{2} \right)} \tag{5.9}$$

Mit der Nebenbedingung

$$\sum_{i=1}^{n} s_{P,i} = L \qquad (5.10)$$

kann die Retentionszeit der Substanz sukzessiv ermittelt werden.
Die Anwendung dieses Modells auf die Eluentenprogramme der Abbildung 5.6 liefert die in Tabelle 5.5 aufgeführten Ergebnisse.

Gradienten-programm	1		2	
Substanz	MC	DDD	MC	DDD
Retentions-zeit (min)				
experimentell	7,3	8,3	7,6	8,6
Modell	7,3	8,3	7,8	9,0

Tab. 5.5 Vergleich der experimentell ermittelten Retentionszeiten mit der Modellrechnung (Gradientenprogramme aus Abb. 5.6)

Die Berechnung der Retentionszeit erfolgte hierbei jeweils in Zeitintervallen, die der Zeit eines Gradientensegments entsprechen.
Bei starken Änderungen der Eluentenzusammensetzung kann eine Auswertung in kleineren Zeitintervallen erforderlich werden.
Die Modellrechnung ergibt eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment. Das Modell ist also zur Abschätzung

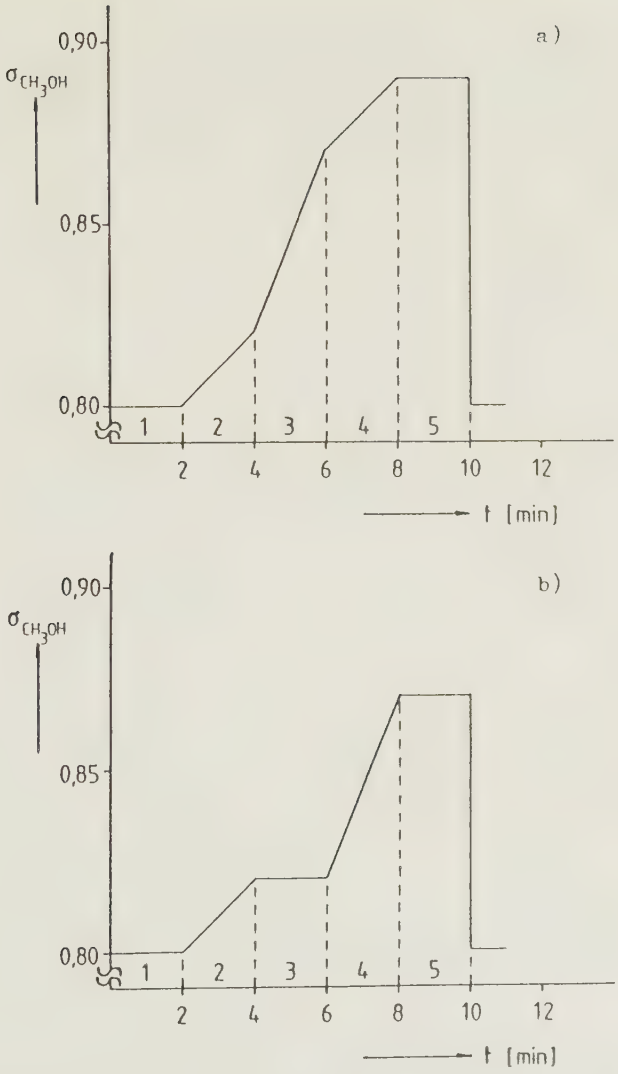


Abb. 5.6 Eluentenprogramme zur Überprüfung der Modellrechnung ($\dot{V}_o$ = 1,20 ml/min)
a) Eluentenprogramm 1
b) Eluentenprogramm 2

der Retentionszeit einer Substanz geeignet.
Durch die Anwendung dieser Modellrechnung kann der ziemlich beträchtliche Aufwand für die Erstellung eines Gradientenprogramms entscheidend verringert werden.

6. Mehrkomponentenanalyse

Die Grundlage für quantitative Analysen im UV-Bereich ist durch das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz gegeben.

$$E_\lambda = -\lg \frac{I_\lambda}{I_{0,\lambda}} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \qquad (6.1)$$

Die Schichtdicke d ist eine Verfahrenskonstante. ε_λ wird als Extinktionskoeffizient bezeichnet. Der Extinktionskoeffizient ist substanzspezifisch und und wellenlängenabhängig. Das Produkt aus der Schichtdicke d und dem Extinktionkoeffizienten ε_λ stellt den Proportionalitätsfaktor zwischen einer vorgegebenen Konzentration c und dem zugehörigen Meßwert, der Extinktion E_λ, dar. Die Extinktion ist hierbei durch den negativen Logarithmus des Quotienten der ohne und mit Probe gemessenen Strahlungsflüsse bestimmt. Die Gültigkeit des Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetzes ist durch die folgenden Nebenbedingungen eingeschränkt:

1. Der Extinktionskoeffizient muß im Meßbereich konzentrationsunabhängig sein. Es dürfen folglich keine Wechselwirkungen zwischen den Molekülen auftreten, die sich in einer Änderung des Extinktionskoeffizienten äußern. Hieraus resultiert eine Begrenzung des nutzbaren Meßbereichs (80,81).
2. Die gemessene Extinktion muß ausschließlich auf der Absorption der Probe beruhen. Es dürfen keine Intensitätsveränderungen durch Reflexion oder Fluoreszenz auftreten.
3. Zur Extinktionsmessung in strukturierten Spektren muß hinreichend monochromatisches Licht verwendet werden.

Bei Spektralphotometern für die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie sind sehr kleine Küvettenvolumina erwünscht, um eine erzielte Auftrennung nicht durch Totzeiteffekte in der Küvette zu verschlechtern. Auch bei dem resultierenden kleinen Küvettenquerschnitt muß die Intensität der Meßstrahlung groß sein, um ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Die Intensität ist vom Lichtleitwert der verwendeten Optik abhängig; bei dem beschriebenen Spektralphotometer (3.1.3) wird eine hohe Intensität durch eine große geometrische Spaltbreite erreicht. Das Produkt aus geometrischer Spaltbreite und der Lineardispersion des Monochromators ist als spektrale Spaltbreite definiert. Für analytische Messungen ausreichende Monochromasie ist im allgemeinen gegeben, wenn die spektrale Spaltbreite kleiner oder höchstens gleich einem Fünftel der Halbwertsbreite der Bande in einem Spektrum ist.
Wenn der Extinktionskoeffizient für eine Substanz an einer Meßstelle entweder durch Eichung oder aus der Literatur bekannt ist, läßt sich mit Gleichung 6.1, unter den genannten Voraussetzungen, aus den Meßwerten der Analyse die Konzentration der Probesubstanz ermitteln. Sind mehrere Komponenten in einer Probe enthalten, so verhalten sich bei Gültigkeit des Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetzes die Extinktionen additiv. Wenn sich der Verlauf der Spektren unterscheidet, können die Konzentrationen der Probesubstanzen durch eine Mehrkomponentenanalyse ermittelt werden. Hierzu müssen jedoch Messungen an unterschiedlichen Meßstellen ausgeführt werden. Für eine Mehrkomponentenanalyse ergibt sich aus Gleichung 6.1

folgendes Gleichungssystem:

$$E_i = d \cdot \sum_{k=1}^{n} (\varepsilon_{ik} \cdot c_k) \qquad (6.2)$$

oder in Matrizenschreibweise

$$\underline{E}_m = \underline{\underline{\varepsilon}}_{m,n} \cdot \underline{c}_n \cdot d$$

mit i = Laufindex der Meßstelle
m = Anzahl der Meßstellen
n = Anzahl der Komponenten

Das Gleichungssystem liefert mathematisch exakte Lösungen bei linearer Unabhängigkeit der Einzelgleichungen und für m = n. Eine Überbestimmung des Systems in der Anzahl der Meßstellen m > n ist möglich. Die m · n Extinktionskoeffizienten müssen für die Analyse bekannt sein.
Die Anwendung des Gleichungssystems 6.2 auf Analyse und Eichung ist im Anhang (9.1) behandelt.

6.1 Verwendete Substanzen

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden Eichsubstanzen zur Pestizid-Analytik* verwendet. In Tabelle 6.1 sind einige physikalische und toxische Eigenschaften der Substanzen wiedergegeben.
Als Lösungsmittel und als Komponente des Eluenten wurde Methanol** benutzt. Die zweite Komponente des Eluenten bildete Wasser. Um die Bildung von Gasblasen in der Apparatur zu verhindern, wurden Methanol mittels Ultraschall und wässrige Lösungen mit Hilfe eines Wasserstrahlvakuums entgast.
Die Einwaage der Substanzen geschah auf einer Analysenwaage auf 10^{-5} g genau. Die Verdünnungen wurden ausgehend von einer Stammlösung durch das Abwiegen aliquoter Teile erreicht. Da sowohl Eich- als auch Analysenproben aus den gleichen Stammlösungen hergestellt wurden, ist der Fehler in der Einwaage zu vernachlässigen. Der Fehler bei der Verdünnung ist vom Verdünnungsgrad abhängig, er sollte jedoch kleiner als $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l sein.
Die Reinheit der verwendeten Substanzen konnte direkt mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie überprüft werden. Alle aufgenommenen Test-Chromatogramme der Reinsubstanzen wiesen lediglich einen einzigen Peak auf. Eine Verunreinigung der Lösungen war nicht festzustellen.

* Fa. Dr. S. u. I. Ehrenstorfer, Augsburg
** Analyzed Reagent, J. T. Baker Chemicals B. V., Deventer, Holland

Substanz	Symbol	F (^{o}C)	Löslichkeit in H_2O (mg/l)	LD_{50}-Ratte oral (mg/kg)	LD_{50}-Fische (mg/l H_2O)	Quelle
Aldrin	Ald	104	0,5	67	0,2	82
p,p'-DDD	DDD	109-110	unlösl.	3400		83
p,p'-DDE	DDE	85	unlösl.	1000		84
p,p'-DDT	DDT	109	0,002	250-300		82,83
Dieldrin	Diel	176	0,1	40-87	0,05	82
Methoxychlor	MC	89	0,1	5000-7000	0,05	82

Tab. 6.1 Physikalische und toxische Eigenschaften der verwendeten Substanzen (Die LD_{50}-Werte für DDT beziehen sich auf ein technisches Gemisch aus 70 % p,p'-DDT, 20 % o,p'-DDT und 10 % Clorbenzolsulfonsäuren)

6.2 Die Auswahl der Meßstellen

Die Ermittlung der Extinktionen ist, wie bereits beschrieben (4.1.4), mit einem Meßfehler behaftet. Im Bereich der Einkomponentenanalyse ist der Einfluß des Meßfehlers auf die Konzentration von der Steigung der Eichgeraden abhängig. Es gilt

$$\sigma(c) = \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \cdot \sigma(E) \qquad (6.3)$$

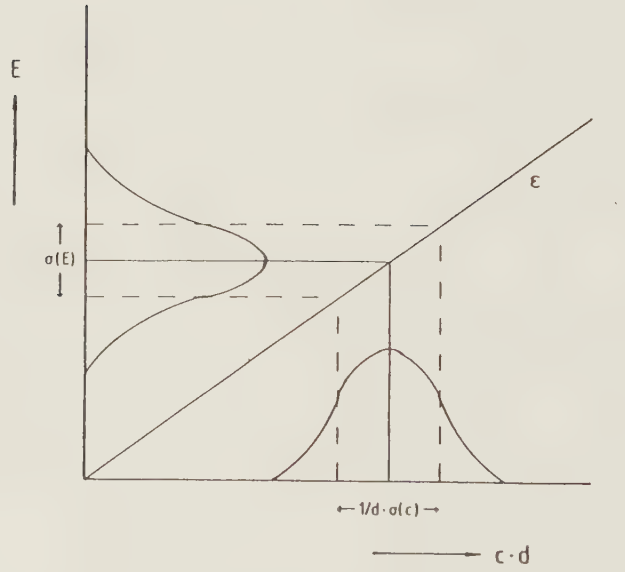


Abb. 6.1 Zur Übertragung des Meßfehlers auf die Konzentration

Die Steigung der Eichgeraden ist als Empfindlichkeit H definiert. Bei einem konstanten Meßfehler führt folglich eine große Empfindlichkeit zu relativ geringen Fehlern bei der Konzentrationsbestimmung. Voraussetzung hierfür ist, daß der Extinktionskoeffizient z.B. durch Wiederholungsmessungen hinreichend bekannt ist.
Bei einer Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen liefert die Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes nach Gauß (45) auf die Bestimmungsgleichungen folgendes Ergebnis für die Empfindlichkeit

$$H_j = \sqrt{\sum_{k=1}^{m} \epsilon_{kj}^2} \qquad (6.4)$$

mit j = Index der Komponente
k = Laufvariable der Meßstelle.

Zur Beschreibung eines Mehrkomponentensystems reicht die in Gleichung 6.4 gegebene Empfindlichkeit nicht aus. Eine notwendige Nebenbedingung zur Lösung des Gleichungssystems 6.2 ist die lineare Unabhängigkeit der Bestimmungsgleichungen. Wenn die Spektren der Komponenten einen ähnlichen Verlauf aufweisen, besteht die Gefahr, daß zwei oder mehr Gleichungen fast Linearkombinationen darstellen. In diesem Falle erhält man ill-conditioned-Gleichungssysteme (85,86), die sich bei kleinen Meßfehlern bösartig verhalten, d.h. es resultieren Ergebnisse, die mit den ursprünglichen Lösungen nicht mehr in Einklang zu bringen sind. Junker und Bergmann berücksichtigen dieses Verhalten des Gleichungssystems bei ihrer Methode der Meßstellenauswahl nach der maximalen Systemdistension (43). Die Systemdistension Θ ist als Mittel-

wert der einzelnen Distensionen θ definiert

$$\Theta = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{1} \theta_i \qquad (6.5)$$

$$\theta_i = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{k=1}^{n} \beta_{ik} \qquad (6.5a)$$

β_{ik} ist der Winkel zwischen dem Zeilenvektor der Meßstelle i und allen anderen Zeilenvektoren.
Dieser Ansatz berücksichtigt zwar die Kondition der Eichmatrix, aber nicht die Empfindlichkeit der Meßstellen.
Kaiser (87) definiert die Empfindlichkeit eines Mehrkomponentensystems als

$$H = |\det \varepsilon| \qquad (6.6)$$

Für überbestimmte Systeme wird dieser Begriff von Junker und Bergmann (42) erweitert zu

$$H = \sqrt{\det |\varepsilon^T \cdot \varepsilon|} \qquad (6.6a)$$

Eine umfassende Betrachtung zur Bewertung der Meßstellen liefert Zinn (45).
Er unterscheidet bei der Fehlerfortpflanzung zwischen dem Einfluß der Empfindlichkeit für die jeweilige Komponente H_j (entsprechend Gleichung 6.4) und der Selektivität des Gleichungssystems nach

$$\sigma_m(c_j) = \frac{1}{d} \cdot \frac{1}{H_j} \cdot \frac{1}{\prod_{\substack{q=1 \\ q \neq j}}^{n} \Xi_{jq}} \cdot \sigma(E) \qquad (6.7)$$

q = Laufindex der Komponenten

mit

$$\Xi_{jq} = \sqrt{1 - \frac{(\Sigma\varepsilon_{kj} \cdot \varepsilon_{kk})^2}{\Sigma\varepsilon^2_{kj} \cdot \Sigma\varepsilon^2_{kk}}} \qquad (6.8)$$

Die Selektivität Ξ kann Zahlenwerte zwischen 0 bei einem unselektiven und 1 bei einem vollständig selektiven System annehmen.

Bei der Verwendung von Spektralphotometern mit großer spektraler Spaltbreite zur Untersuchung von stark strukturierten Spektren empfiehlt Klukas (47) eine Meßstellenauswahl nach dem minimalen Filterfehler. Geeignete Meßstellen bilden bei diesem Auswahlkriterium die Bandenflanken. Diese Meßstellenauswahl ermöglicht eine Analyse über einen relativ großen Konzentrationsbereich, allerdings immer zu Lasten einer geringeren Empfindlichkeit.

Diese Auswahlmethode ist wegen des Verlustes an Empfindlichkeit bei der Mehrkomponentenanalyse der polychlorierten Pflanzenschutzmittel nicht empfehlenswert, da diese nur relativ geringe Extinktionskoeffizienten im UV-Bereich aufweisen. Da die Spektren dieser Substanzen zudem wenig strukturiert sind, wird kein großer Einfluß des Filterfehlers auf die Linearität der Analysenfunktion erwartet (vgl. 6.5).

Zur Auswahl der Meßstellen für die Modellsysteme 1-6 wurde folgender Weg beschritten:

Durch die Funktionserweiterung am Spektralphotometer war es möglich,die UV-Spektren im Bereich von 220 nm bis 300 nm digital aufzunehmen. Mit Hilfe des Programms KURV (9.2.3) konnten aus den berechneten Extinktionskoeffizienten ε_λ die Differenzspektren nach

$$\varepsilon_{D,j} = \left|\left(\sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i\right) - \varepsilon_j\right| \qquad \text{mit } i \neq j$$

ermittelt werden. Die relativen Maxima dieser Funktion stellen für die jeweilige Komponente j die empfindlichste Meßstelle dar. Die relativen Extrema werden von dem Rechenprogramm ausgegeben. Der Graph der Funktion kann geplottet werden.
Eine Bewertung der Meßstellen erfolgt mit dem von Zinn vorgeschlagenen Verfahren mit Hilfe der Empfindlichkeit und der Selektivität.

6.3 Auswerteverfahren

Für die Auswertung der vermessenen Chromatogramme wurde die Peakfläche als Konzentrationsmaß herangezogen. Bei der Gradienten-Elution weisen die Grundlinien für die jeweiligen Meßstellen einen von der Eluentenzusammensetzung abhängigen Verlauf auf (vgl. Abb. 5.2). Durch Subtraktion eines ohne Probenaufgabe bei gleichem Gradientenverlauf ermittelten Chromatogramms konnte ein linearer Verlauf der Grundlinie erreicht werden. Diese Maßnahme war durch die hohe Reproduzierbarkeit der Eluentenzusammensetzung (5.3) möglich. Die Drift des Spektralphotometers (vgl. 4.1.5), die sich bei der Aufnahme von umfangreichen Meßreihen störend bemerkbar machte, konnte durch eine zusätzliche Grundlinienkorrektur korrigiert werden. Da die Grundlinien durch diese Maßnahmen einen linearen Verlauf aufwiesen, konnte das Überschreiten eines Schwellenwertes als Peakerkennungskriterium gewählt werden.
Zur Ermittlung der Konzentrationen aus den Meßwerten eines Chromatogramms können die nachfolgend beschriebenen Auswerteverfahren herangezogen werden.

6.3.1 Das integrale Verfahren

Bei diesem Verfahren werden für jede Meßstelle die Extinktionswerte aller Meßzyklen eines Peaks aus einem Chromatogramm addiert. Aus den jeweiligen Peakflächen aller Meßstellen werden die Extinktionen der dosierten Probe berechnet.
Da die dosierte Substanzmenge $m_D = c_D \cdot V_D$ gleich der detektierten Substanzmenge m sein muß, folgt aus

$$m_D = m$$

$$c_D \cdot V_D = \int_{V_2}^{V_1} c \, dV$$

mit V_1, V_2 = Integrationsgrenzen
Für eine konstante Strömungsgeschwindigkeit

$$\frac{dV}{dt} = d\dot{V}_o$$

folgt hieraus

$$c_D \cdot V_D = \int_{t_1}^{t_2} c \cdot \frac{dV}{dt} \, dt = \dot{V}_o \cdot \int_{t_1}^{t_2} c \, dt \qquad (6.9)$$

mit t_1, t_2 = Integrationsgrenzen
Unter Berücksichtigung des Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetzes (Gl.6.1) ergibt sich hieraus

$$E_D = \frac{\dot{V}_o}{V_D} \cdot \int_{t_2}^{t_1} E \, dt \qquad (6.10)$$

Mit den auf diese Weise erhältlichen Extinktionen der Probelösung lassen sich durch Einsetzen in die Gleichung 6.1 oder das Gleichungssystem 6.2 Eichung und Analyse durchführen.

6.3.2 Das differentielle Verfahren

Bei diesem Verfahren werden aus den in einem Meßzyklus ermittelten Extinktionswerten durch Lösung des Gleichungssystems 6.2 die jeweils aktuellen Konzentrationen der Probe im Eluat ermittelt.
Mit Hilfe einer Umformung von Gleichung 6.8 kann aus den ermittelten Konzentrationswerten aller zu einem Peak gehörenden Zyklen auf die Konzentrationen

der dosierten Probe geschlossen werden.

$$c_D = \frac{\dot{V}_o}{V_D} \cdot \int_{t_1}^{t_2} c \, dt$$

$$= \frac{\dot{V}_o}{V_D} \cdot \Delta t \cdot \lim_{n \to \infty} \sum_{i=1}^{n} c_i \qquad (6.11)$$

mit Δt = Zeitintervall zwischen zwei Meßpunkten
Dieses Verfahren setzt im Prinzip voraus, daß die Meßwerte zeitgleich ermittelt werden. Diese Forderung ist mit der verwendeten Apparatur nicht zu erfüllen. Staat (46) konnte jedoch zeigen, daß sich für symmetrische Peakformen und eine hohe Meßstellendichte die durch Zeitdifferenzen in einen Meßzyklus bedingten Fehler bei der Konzentrationsbestimmung gegenseitig aufheben.
Das differentielle Verfahren hat die folgenden Nachteile gegenüber dem integralen Verfahren:
1. Es ist rechenzeitintensiver, da für jeden Meßzyklus das Gleichungssystem 6.2 gelöst werden muß.
2. Eine Eichung nach diesem Verfahren ist nicht möglich.
3. Das Verfahren führt bei unsymmetrischen Peakformen auf Grund von Zeitdifferenzen zwischen den Meßwerten eines Meßzyklus zu zusätzlichen Fehlern.

6.3.3 Das partielle Verfahren

Das partielle Verfahren stellt eine Weiterentwicklung des integralen Verfahrens dar. Im Gegensatz zum integralen Verfahren wird aber die chromatographische Auflösung bei der Auswertung berücksichtigt. Im Chromatogramm werden den Peakformen entsprechend Integrationsgrenzen gewählt. Geeignete Integrations-

grenzen bilden die relativen Extrema des Chromatogramms. Die Eichmatrix kann jeweils den Komponenten bezüglich der Anzahl der zu berücksichtigenden Komponenten und Meßstellen angepaßt werden.
Mit diesem Verfahren können beliebig viele aufeinander folgende Peaks ausgewertet werden, solange die Meßstellen zur Analyse der entsprechenden Komponenten geeignet sind.
Es erwies sich für die behandelten Modellsysteme als ausreichend, die Integrationsgrenzen so zu wählen, daß jeweils ein Peak vollständig integriert wurde. Die Auswertung geschah mit Hilfe des Programms MECO. Das Programm erlaubt für jedes Intervall die Wahl einer geeigneten Eichmatrix.
Die Eichung kann mit Reinkomponenten oder Komponentengemischen nach dem integralen Verfahren erfolgen.
Die numerische Auswertung erfolgt mit dem Programm EIPO. Da die Peakerkennungskriterien beider Rechenprogramme gleich gewählt sind, entsprechen die Bedingungen der Eichung den Analysenbedingungen.

6.4 Integrationsmethoden

Zur Berechnung der Extinktion der dosierten Probelösung ist für das integrale und das partielle Verfahren entsprechend der Gleichung 6.9 das folgende Integral zu lösen:

$$\int_{t_1}^{t_2} E \, dt$$

t_1 und t_2 bilden die Integrationsgrenzen.
Wenn die Funktion $E = f(t)$ bekannt ist, läßt sich das Integral exakt lösen. Ist diese Funktion nicht bekannt, so ist man auf numerische Näherungsmethoden angewiesen.
Die Eignung verschiedener Integrationsmethoden wurde untersucht. Hierzu wurde in der Meßreihe 6.1 aus 13 digital aufgezeichneten Chromatogrammen jeweils der Peak einer dosierten Methoxychlor-Lösung ($c = 1{,}13 \cdot 10^{-3}$ mol/l) mit der entsprechenden Methode integriert. Peakerkennungskriterium war das Überschreiten eines Schwellenwertes (3σ). Die Versuchsbedingungen der Meßreihe 6.1 sind in Tabelle 9.1 aufgeführt.
Die Auswertung der Chromatogramme geschah mit entsprechend modifizierten Versionen des Analysenprogramms MECO. Anschließend wurde schrittweise die Anzahl der Stützpunkte verringert und erneut eine Flächenbestimmung durchgeführt. Hiermit sollte festgestellt werden, welches Verfahren bei geringer Stützpunktdichte zur Bestimmung der Peakfläche geeignet ist.

6.4.1 Die Rechteckmethode

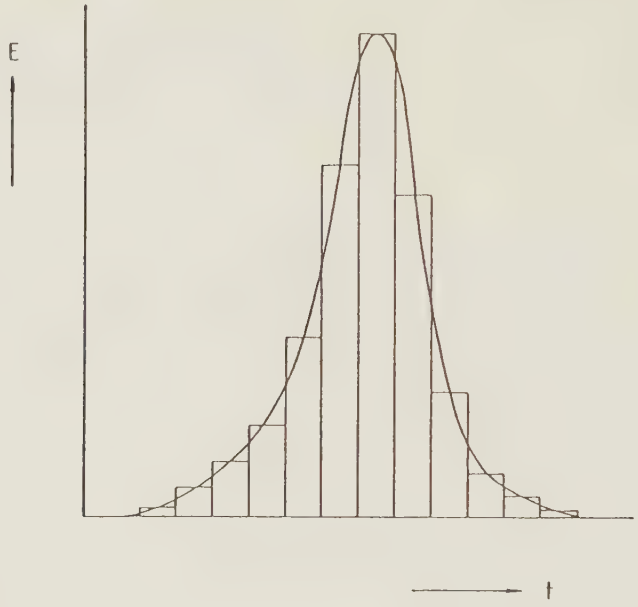


Abb. 6.2 Schematische Darstellung der Integration nach der Rechteckmethode

Die Rechteckmethode ist das für numerische Integrationen gebräuchlichste Verfahren. Das Integral wird hierbei abschnittsweise durch das Produkt aus digitalem Meßwert E_i und der Zeitdauer Δt zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen an der gleichen Meßstelle angenähert. Die Güte der Näherung ist von der Anzahl n der zu einem Peak gehörenden Meßzyklen abhängig. Es gilt

$$A = \int_{t_1}^{t_2} E \, dt = \lim_{n \to \infty} \Delta t \cdot \sum_{i=1}^{n} E_i \qquad (6.12)$$

A = Peakfläche

t_1, t_2 = Integrationsgrenzen

Die Bedingung, daß die Anzahl der Meßzyklen unendlich groß wird, ist mit der Meßanordnung nicht zu erfüllen. In Tabelle 9.2 sind die mittleren Peakflächen für die Meßstellen 229 nm und 248 nm und die Reproduzierbarkeit der Flächenbestimmung bei unterschiedlicher Meßstellendichte aufgeführt. Bezugspunkt für die angegeben relativen Peakflächen ist die aus durchschnittlich 22 Meßpunkten berechnete Fläche. Das Auswerteprogramm berücksichtigt jeweils einen Meßzyklus vor dem Überschreiten des Peakerkennungskriteriums und einen Zyklus nach dem Unterschreiten dieses Limits. Hieraus resultiert eine relative Ausweitung der Integrationsgrenzen für Peaks mit großem Stützpunktabstand. Aus Abbildung 6.3 ist zu entnehmen, daß auch bei einer Verringerung der Stützpunktanzahl das Peakflächenverhältnis innerhalb der Meßreihe nahezu konstant bleibt.
Die Peakflächenmittelwerte fallen bei der Unterschreitung von 10 Meßpunkten pro Meßstelle und Peak stark ab. Neben diesem Fehler in der Absolutbestimmung bewirkt die Verringerung der Stützpunkte auch eine größere Streuung der einzelnen Meßwerte. Bis zu einer Anzahl von 9 Meßpunkten steigt der Variationskoeffizient nicht stark an. Bei einer weiteren Verringerung auf 7 Meßpunkte verdoppelt sich der Variationskoeffizient näherungsweise.
Wie schon in früheren Untersuchungen (46,47) gezeigt wurde, ist die Rechteckmethode als numerische

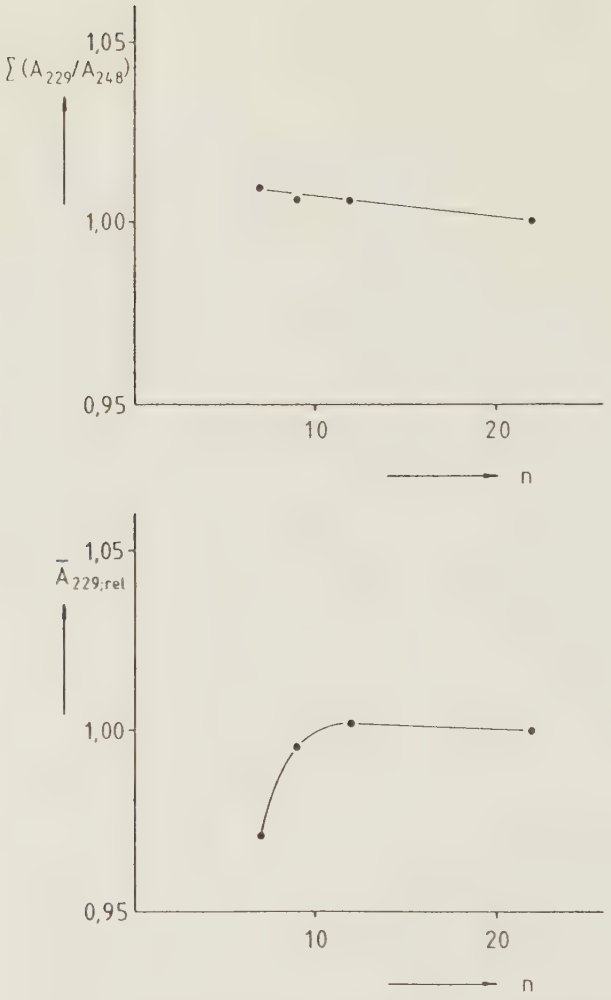


Abb. 6.3 Oben: Abhängigkeit der Summe der relativen Peakflächenverhältnisse von der Stützpunktanzahl n pro Peak für 229 nm und 248 nm
Unten: Abhängigkeit der relativen Peakflächenmittelwerte bei 229 nm von der Stützpunktanzahl n pro Peak

Integrationsmethode auf Peaks anwendbar, die durch 10 und mehr Meßpunkte einer Meßstelle beschrieben sind.

6.4.2 Das Simpsonsche Näherungsverfahren

Weitere Verfahren zur numerischen Integration sind die Trapezformel, mit deren Hilfe das Flächenintegral zwischen zwei Meßpunkten durch ein Trapez dargestellt wird, und die Simpsonsche Regel.
Die Simpsonsche Regel nähert den Kurvenverlauf zwischen zwei Meßpunkten parabelförmig an. Die Flächenbestimmung eines Peaks in den Grenzen t_1 und t_2 erfolgt nach

$$A = \frac{t_2 - t_1}{3n} \cdot (E_o + 4E_1 + 2E_2 + 4E_3 + \ldots + 2E_{n-2} + 4E_{n-1} + E_n) \qquad (6.13)$$

E_o und E_n sind hierbei die zu den Integrationsgrenzen t_1 und t_2 gehörenden Meßwerte. Zur Flächenberechnung nach der Simpsonschen Regel wird eine gerade Anzahl von Meßpunkten pro Peak benötigt. Hierdurch bedingt wird bei der Auswertung teilweise die Integrationsgrenze um einen Meßpunkt auf der Grundlinie erweitert. Die Integration nach diesem Verfahren ist ebenfalls von der Anzahl der Meßpunkte pro Peak abhängig. Eine Fehlerbetrachtung (88,89) führt zu dem Ergebnis, daß bei einer vorgegebenen Anzahl von Meßpunkten das Simpsonsche Näherungsverfahren eine genauere Flächenbestimmungsmethode darstellt als das Rechteckverfahren oder die hier nicht behandelte Trapezformel.

Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der mit der Simpsonschen Näherung berechneten relativen Peakflächen sind für unterschiedliche Stützpunktabstände in Tabelle 9.2 aufgeführt. Die Flächen sind relativ zu dem Mittelwert der aus jeweils 22 Meßpunkten mit der Recheckmethode berechneten Flächen angegeben.
Bei einer Stützpunktanzahl von 22 Meßpunkten liefert diese Integrationsmethode dieselben Ergebnisse für die Mittelwerte der Peakflächen aus 13 Chromatogrammen, die Streuung der Einzelwerte ist jedoch etwas größer. Bis zu einer Verringerung der Anzahl der Meßpunkt auf 9 Punkte pro Peak liefert das Simpsonsche Verfahren genauere Peakflächenmittelwerte als die Rechteckmethode, allerdings mit einer größeren Streuung. Bei 7 Meßpunkten pro Peak weisen die Peakflächenmittelwerte einen größeren absoluten Fehler aber eine kleinere Streuung auf.
Ob signifikante Unterschiede zwischen den Auswertemethoden bestehen, muß durch einen Vergleich der Peakflächenmittelwerte und der Variationskoeffizienten getestet werden (vgl. 6.4.4).

6.4.3 Die exakte sukzessive Integration

In Anlehnung an ein von Savitzky und Golay (90) zur Kurvenglättung vorgeschlagenes und von Dietrich (91) weiterentwickeltes Verfahren kann der Kurvenverlauf einer Funktion abschnittsweise durch Polynome angenähert werden. Die Polynome können jeweils exakt integriert werden. Für z aufeinanderfolgende Meßpunkte liefert ein Polynom der Form

$$E = a_o + a_1 \cdot t + a_2 \cdot t^2 + \ldots + a_{z-1} \cdot t^{z-1} \quad (6.14)$$

eine eindeutig Beschreibung.
Die Proportionalitätskonstanten können entweder schrittweise elementar oder mit Hilfe der Matrizenrechnung bestimmt werden. Die Integration des Polynoms in den Grenzen t_1 und t_2 liefert

$$\int_{t_1}^{t_2} E \, dt = a_o \cdot t + \frac{a_1}{2} \cdot t^2 + \frac{a_2}{3} \cdot t^3 + \ldots + \frac{a_{z-1}}{z} \cdot t^z \Big|_{t_1}^{t_2} \quad (6.14a)$$

Mit Hilfe einer Koordinatentransformation kann erreicht werden, daß das betrachtete Intervall symmetrisch zum Ursprung des Koordinatensystems liegt und die Abszissenwerte Elemente der natürlichen Zahlen darstellen.
Die Integration wird jeweils nur für ein Intervall symmetrisch zum Ursprung ausgeführt. Die Größe des Intervalls wird dabei so gewählt, daß sie dem Abstand zweier Meßpunkte entspricht. Die Berechnung des Integrals vereinfacht sich durch die symmetrische Lage des Intervalls zum Ursprung, da nur die Summanden

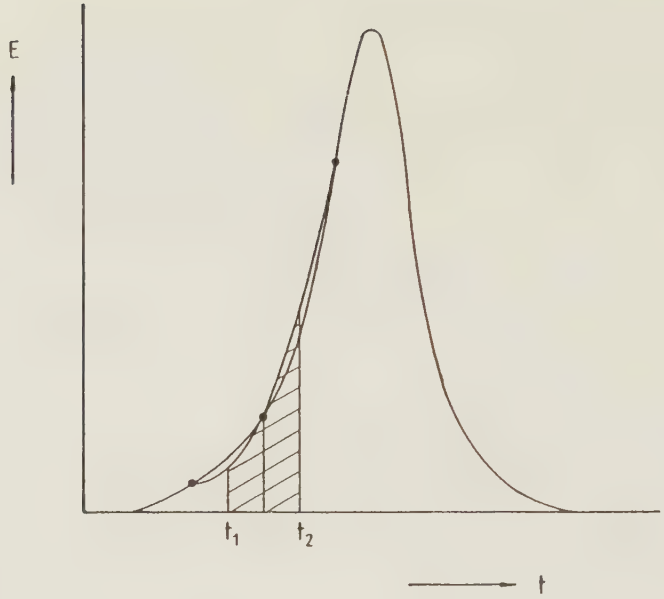


Abb. 6.4 Anpassung von 3 Meßpunkten auf einem Peak durch ein Polynom 2. Grades; Integration im Intervall t_1, t_2

mit geraden Exponenten der Gleichung 6.14a einen Beitrag liefern.
Dieses Verfahren kann durch sukzessive Verschiebung der Meßpunkte zur Integration der gesamten Peakfläche genutzt werden.
Zur Auswertung der Meßreihe 6.1 wurden ein Polynom 2. Grades und ein Polynom 4. Grades benutzt (Tab. 9.3). Die Ergebnisse dieser Integrationsmethoden sind mit denen der Rechteckintegration vergleichbar.
Die Streuung der Peakflächen ist geringer als bei der Rechteckintegration. In Abschnitt 6.4.3 wird die Signifikanz dieser Unterschiede geprüft.

6.4.4 Die exakte sukzessive Integration anschließend an eine Least-Squares-Anpassung

Der Unterschied zum vorher beschriebenen Verfahren besteht darin, daß die Anzahl der Meßpunkte zur Berechnung der Proportionalitätskonstanten eines Polynoms größer gewählt wird, als zur exakten Bestimmung benötigt. Mit Hilfe der Least-Squares-Anpassung können hierdurch zufällige Meßfehler eliminiert werden. Die Anpassung eines Polynoms 2. Grades an jeweils 5 Meßpunkte bildet die Grundlage der in Tabelle 9.3 wiedergegebenen Auswertungen.
Der Vergleich der beschriebenen Integrationsmethoden für die jeweilige Stützpunktanzahl muß die berechneten Flächenmittelwerte und die Varianzen beinhalten.
Zum Vergleich der Flächenmittelwerte wird der t-Test (93) benutzt. Die Nullhypothese, die aussagt, daß beide Mittelwerte der gleichen Grundgesamtheit angehören, muß angenommen werden, wenn der experimentell ermittelte t-Wert kleiner oder gleich dem Tafelwert auf dem gewählten Signifikanzniveau ist.
Der Vergleich zwischen den Modellen wird relativ zu den Ergebnissen der Rechteckintegration ausgeführt. Es wird geprüft, ob eine andere Integrationsmethode signifikant bessere Ergebnisse liefert als die Rechteckmethode.
Die experimentell ermittelten Werte der t-Verteilung sind kleiner oder gleich $t_{exp} = 0{,}76$. Der Tafelwert beträgt $t_{(13,95)} = 2{,}16$. Die untersuchten Integrationsmethoden weisen also in den erhaltenen Peakflächenmittelwerten mit 95% statistischer Sicherheit keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen der Rechteckmethode auf.

Die Hypothese, daß die Varianzen zweier Stichproben gleich sind, wird mit dem F-Test nach Fischer (93) geprüft. Der experimentell ermittelte Wert der F-Verteilung beträgt maximal $F_{exp} = 1,48$. Durch den Vergleich mit dem Tabellenwert $F_{(13,13,95)} = 2,58$ kann auch hier mit 95% statistischer Sicherheit kein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen der Rechteckmethode festgestellt werden.
Da die untersuchten Integrationsmethoden weder in den Peakflächenmittelwerten noch in der Streuung der einzelnen Meßwerte statistisch signifikante Unterschiede aufweisen, wird für die weiteren Auswertungen die Rechteckmethode benutzt. Diese Methode bietet den Vorteil des geringsten Rechenaufwandes.

6.5 Prüfung der Linearität der Analysenfunktion

Es ist zu prüfen, ob die Abhängigkeit zwischen Peakfläche und Konzentration im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich linear verläuft. Nichtlinearitäten können aus den bereits beschriebenen konzentrationsabhängigen Abweichungen von dem benutzten Modell, dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz (vgl. 6), aus der Wahl der Integrationsgrenzen und der unterschiedlichen Meßpunktanzahl resultieren. Diese störenden Einflüsse können durch die Erweiterung der Analysenfunktion um ein zusätzliches quadratisches Glied beschrieben werden. Hiermit ist jedoch ein erheblich höherer Aufwand für die Eichung verbunden.
Zur Untersuchung der Analysenfunktion wurden Methoxychlor-Lösungen der angegebenen Konzentrationen dosiert und chromatographiert.
Die Versuchsbedingungen der Meßreihe 6.2 sind in Tabelle 9.1 enthalten.
Die Auswertung der Chromatogramme geschah mit Hilfe der Programme EIPO für die Eichung und MECO für die Analyse.
Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 6.4 zusammengefaßt.
Die Peakflächen bei den jeweiligen Meßstellen sind linear von der Konzentration der dosierten Lösung abhängig. Die Anpassung der Meßwerte an die Ausgleichsgerade wird durch den Korrelationskoeffizienten und die Reststreuung σ_{xy} charakterisiert. Durch einen Vergleich der experimentell ermittelten Werte der t-Verteilung mit den entsprechenden Tafenwerten kann mit 95% statistischer Sicherheit festgestellt werden, daß der Achsenabschnitt der Ausgleichsgeraden

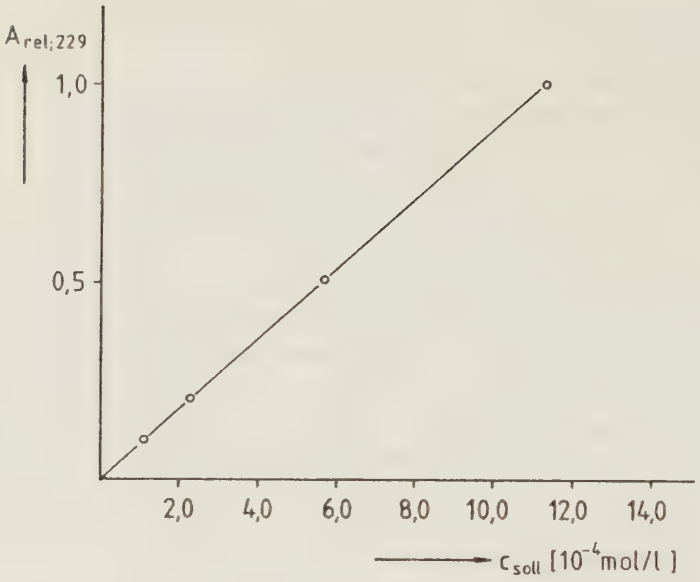


Abb. 6.5 Prüfung der Linearität der Peakflächen bei 229 nm für Methoxychlor-Lösungen der angegebenen Konzentrationen

nicht signifikant ist.
Im betrachteten Konzentrationsbereich kann also das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz als Analysenfunktion dienen. Eine Analyse, nach der vorangegangenen Eichung mit den Meßwerten der Lösung 2, bestätigt diese Aussage.

Lösung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	A_{229};rel	A_{248},rel	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)
1	11,30	1,000	1,000	11,21
2	5,66	0,505	0,512	5,66
3	2,26	0,207	0,204	2,30
4	1,13	0,097	0,096	1,08
m (10^2 l/mol)		8,84	8,87	
A_o (10^{-3})		2,48	1,89	
r		0,9999	0,9999	
σ_{xy} (10^{-3})		5,38	7,84	

Tab. 6.2 Prüfung der linearen Abhängigkeit der erhaltenen relativen Peakflächen von der Konzentration der dosierten Methoxychlor-Lösungen. Ermittlung der Analysenwerte nach Eichung mit den Meßwerten aus Lösung 2
m,A_o = Parameter der Ausgleichsgeraden
r = Korrelationskoeffizient
σ_{xy} = Reststreuung

6.6 Die Nachweisgrenze

Der Meßwert an der Nachweisgrenze X wurde von Kaiser und Specker (92) definiert durch

$$X = X_{Bl} + 3\sigma \qquad (6.15)$$

mit σ = Standardabweichung des Blindwerts
Der Blindwert X_{Bl} kann am Spektralphotometer elektronisch kompensiert werden oder bei digitalen Meßwerten subtrahiert werden. Es gilt somit für den Anzeigenwert E_{NWG}

$$E_{NWG} = 3\sigma \qquad (6.16)$$

mit 3σ = Rauschen des Spektralphotometers ($E \approx 0$).
In der Flüssigkeits-Chromatographie wird mit Hilfe von Gleichung 6.9 von der Extinktion des Chromatogramms auf die Extinktion der dosierten Probelösung geschlossen. Wird die Peakfläche mit der Rechteckmethode ermittelt (Gl. 6.12), so ergibt sich folgender Zusammenhang

$$E = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d = \frac{\dot{V}_o}{V_D} \cdot \Delta t \cdot \sum_{i=1}^{n} E_i \qquad (6.17)$$

Wenn die einzelnen Meßwerte E_i im Bereich der Nachweisgrenze liegen, folgt durch Kombination der Gleichungen 6.16 und 6.17

$$E = \varepsilon_\lambda \cdot c_{NWG} \cdot d = \frac{\dot{V}_o}{V_D} \cdot \Delta t \cdot \sum_{i=1}^{n} 3\sigma$$

Auflösung nach der Konzentration der dosierten Lösung ergibt bei stochastischem Rauschen

$$c_{NWG} = \frac{1}{\varepsilon_\lambda \cdot d} \cdot \frac{\dot{V}_o}{V_D} \cdot \Delta t \cdot 3\sigma \cdot \sqrt{n} \qquad (6.18)$$

mit n = Anzahl aufeinanderfolgender Meßpunkte, in denen das Rauschen signifikant überschritten werden soll

Bei der Aufnahme digitalisierter Chromatogramme ist es sinnvoll zu postulieren, daß zur Peakerkennung im Bereich der Nachweisgrenze sich mehrere aufeinanderfolgende Meßwerte aus dem Rauschen hervorheben. Diese Bedingung ist erfüllt für

$$\Delta t \leq b_{0,5}$$

Mit $$b_{0,5} = t_R \cdot \sqrt{5,54 \cdot h/L}$$

folgt aus Gleichung 6.18

$$c_{NWG} = \frac{t_R \cdot \dot{V}_o}{\varepsilon_\lambda} \cdot \frac{3\sigma}{d \cdot V_D} \cdot \sqrt{5,54 \cdot h/L} \qquad (6.19)$$

In übersichtlicher Form kann diese Gleichung folgendermaßen dargestellt werden

$$c_{NWG} = \frac{t_R \cdot \dot{V}_o}{\varepsilon_\lambda} \cdot k \qquad (6.19a)$$

mit k = Gerätekonstante

Werden Messungen an mehreren Meßstellen ausgeführt, so ist die Empfindlichkeit durch Gleichung 6.4 bestimmt. Hiermit folgt für die Nachweisgrenze bei einer Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen

$$c_{NWG,j} = \frac{t_R \cdot \dot{V}_o}{H_j} \cdot k \qquad (6.20)$$

Soll die Nachweisgrenze unter den Bedingungen der Mehrkomponentenanalyse betrachtet werden, so muß die Selektivität des Systems berücksichtigt werden. Nach Jacob (49) gilt

$$c_{NWG;j} = c_{NWG;rein} \cdot \left(\prod_{\substack{q=1 \\ q \neq j}}^{n} \Xi_{jq} \right)^{-1} \qquad (6.21)$$

Da die Selektivität nur Zahlenwerte zwischen 0 und 1 annehmen kann, ist die Nachweisgrenze einer Substanz im Rahmen einer Mehrkomponentenanalyse immer höher oder im günstigsten Fall gleich der Nachweisgrenze der Einzelbestimmung.

6.7 Das Zweikomponentensystem Methoxychlor-DDD

Das entwickelte Analysenverfahren wurde zur Analyse von MC-DDD-Lösungen herangezogen. Die beiden Komponenten werden mit der angegebenen isokratischen Arbeitsweise nicht vollständig aufgetrennt, so daß sich die Notwendigkeit zur Durchführung einer Zweikomponentenanalyse ergibt, falls nicht eine mittel- und zeitintensive Optimierung der chromatographischen Parameter erfolgen soll. Die chromatographischen Parameter sind in Tabelle 6.3 aufgeführt.

	MC	DDD
t_R (min)	6,4	7,4
$b_{0,5}$ (min)	0,30	0,35
h (10^{-2} cm)	1,00	1,01

Tab. 6.3 Chromatographische Parameter für die Modelle 1 und 2 (t_0 = 1,70 min)

Geeignete Meßstellen für die Mehrkomponentenanalyse werden dem Differenzspektrum der Substanzen entnommen (vgl. 9.6).
Die Eichung erfolgte mit Hilfe der Reinkomponenten, den Lösungen 1 und 5. Die in Tabelle 6.4 angegebenen Eichkoeffizienten stimmen mit dem Verlauf der registrierten Spektren der Substanzen überein.
Mit Hilfe der Gleichungen 6.4 und 6.8 werden die Empfindlichkeiten und die Selektivität der Modelle bestimmt.

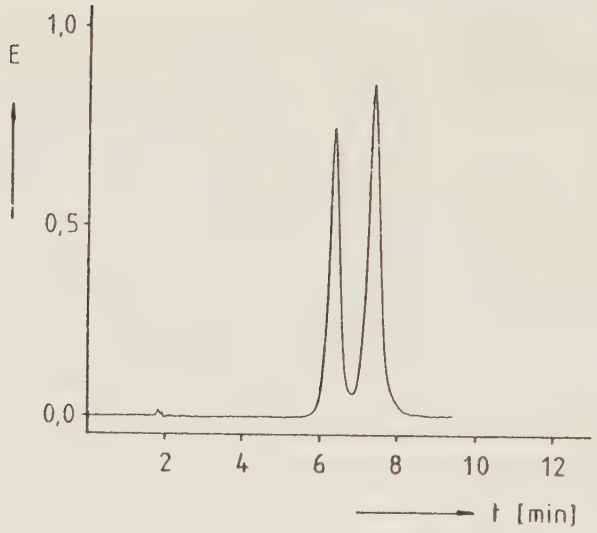


Abb. 6.6 Chromatogramm der Komponenten Methoxychlor ($c = 11{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und DDD ($c = 11{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) bei 248 nm

	ε (l mol^{-1} cm^{-1})	
λ (nm)	MC	DDD
229	15141	21146
248	9541	9253
H (l mol^{-1} cm^{-1})	17896	23082

Tab. 6.4 Eichkoeffizienten für die Modelle 1 und 2 ($\Xi_{MC;DDD} = 0{,}15$)

6.7.1 Modell 1: Zweikomponentenanalyse

Die Ergebnisse der Zweikomponentenanalyse sind in Tabelle 9.4 wiedergegeben. Eine Beurteilung der Meßreihen ist mit Hilfe der Sollwertabweichung der Komponenten

$$SA_k = \sqrt{\frac{\sum (c_{Ist} - c_{Soll})^2}{n}} \qquad (6.22)$$

möglich. Die Gesamtsollwertabweichung der Analyse ergibt sich nach

$$SA = \frac{\sum SA_k}{N}$$

N = Anzahl der Komponenten

Die Sollwertabweichungen des Modells 1 sind in Tabelle 6.5 angegeben.

Die Meßergebnisse des Modells 1 (Tab. 9.4) weisen einen systematischen Fehler auf. In der Mehrzahl der Proben wird die Konzentration des DDD zu niedrig und die des MC zu hoch bestimmt.

In den Mischungen 9-12 zeigt sich dieser Effekt besonders deutlich, bedingt durch die geringe Selektivität der Eichmatrix und der daraus resultierenden Fehlerübertragung.

Der beobachtete systematische Fehler kann als Ursache eine unzureichende Grundlinienkorrektur haben. In Modell 2 soll versucht werden, diesen Fehler durch eine Verbesserung des Auswerteprogramms auszuschalten.

6.7.2 Modell 2: Zweikomponentenanalyse nach vorhergehender Glättung der Chromatogramme

In diesem Modell wurden die Meßwerte jeder Meßstelle mit Hilfe einer Dreieckfunktion geglättet. Diese Maßnahme gestattet eine genauere Bestimmung der Integrationsgrenzen mit der zur Peakerkennung benutzten Schwellenmethode. Durch eine Grundlinienkorrektur konnte der Einfluß der Drift des Spektralphotometers (vgl. 4.1.5), der sich besonders bei größeren Meßreihen störend auswirkte, verringert werden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 9.5 zusammengefaßt.

	Modell 1		Modell 2	
	MC	DDD	MC	DDD
SA_k (10^{-5} mol/l)	4,37	2,76	2,56	3,54
$\bar{c}$ (10^{-4} mol/l)	5,32	5,47	5,32	5,47
SA (10^{-5} mol/l)	3,57		3,05	

Tab. 6.5 Sollwertabweichungen der Modelle 1 und 2

In den Meßergebnissen des Modells 2 (Tab. 9.5) kann keine systematische Abweichung von den Sollwerten festgestellt werden. Die Sollwertabweichung der

Komponente Methoxychlor ist im Modell 2 geringer als im Modell 1, während die Sollwertabweichung der Komponente DDD vergrößert wurde. Die Gesamtsollwertabweichung des Modells 2 ist geringer als die des Modells 1. Eine Prüfung der Signifikanz dieser Veränderungen erfolgt mit dem bereits beschriebenen F-Test. Die Verringerung der Sollwertabweichung des Methoxychlor in Modell 2 erweist sich mit 95% statistischer Sicherheit als signifikant. Die weiteren Veränderungen sind auf diesem Niveau statistisch nicht signifikant.
Mit Hilfe der Gleichung 6.7 kann aus der Streuung der Meßwerte auf die erwartete Streuung der Analysenwerte geschlossen werden. Der Fehler der Meßwerte kann durch die Streuung der Peakflächen in Tabelle 9.2 gegeben werden. Die Chromatogramme der Modelle 1 und 2 weisen pro Meßstelle 10 bis 20 Meßpunkte für einen Peak auf. Der Tabelle 9.2 kann hierfür ein Variationskoeffizient von 4,2% entnommen werden. Die erwarteten Streuungen der Analysenergebnisse betragen hiermit $\sigma(c_{MC}) = 1{,}13 \cdot 10^{-4}$ mol/l und $\sigma(c_{DDD}) = 1{,}45 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Die ermittelten Sollwertabweichungen sind um den Faktor 2 bis 3 kleiner als der erwartete Analysenfehler.

Substanz	$c_{NWG;rein}$ (10^{-6}mol/l)	c_{NWG} (10^{-6}mol/l)	m_{NWG} (10^{-7}g)
MC	2,27	15,3	1,31
DDD	2,05	13,7	1,10

Tab. 6.6 Nachweisgrenzen der Substanzen Methoxychlor und DDD in den Modellen 1 und 2 berechnet für die dosierte Probelösung

6.8 Das Vierkomponentensystem Methoxychlor, DDD, DDT, DDE

Die Komponenten werden in zwei Gruppen eluiert. Die erste Gruppe bilden Methoxychlor und DDD; danach werden DDT und DDE eluiert. Die Peaks überlappen je nach Konzentration bis zur halben maximalen Signalhöhe. Der Einsatz der Gradienten-Elution bewirkte eine Verkürzung der Analysendauer ohne Einbuße an chromatographischer Auflösung.

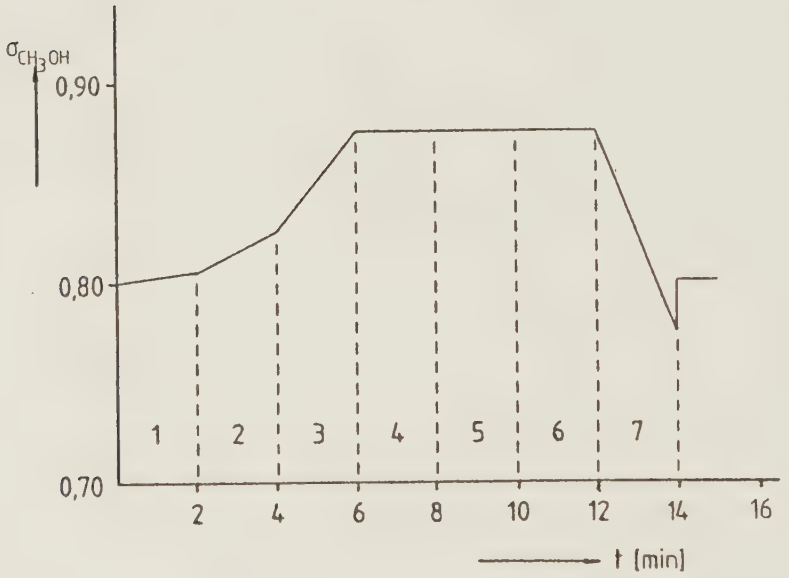


Abb. 6.7 Eluentenprogramm für ein Methanol-Wasser-Gemisch bestehend aus 7 Segmenten zur Analyse des Vierkomponentensystems MC, DDD, DDT, DDE

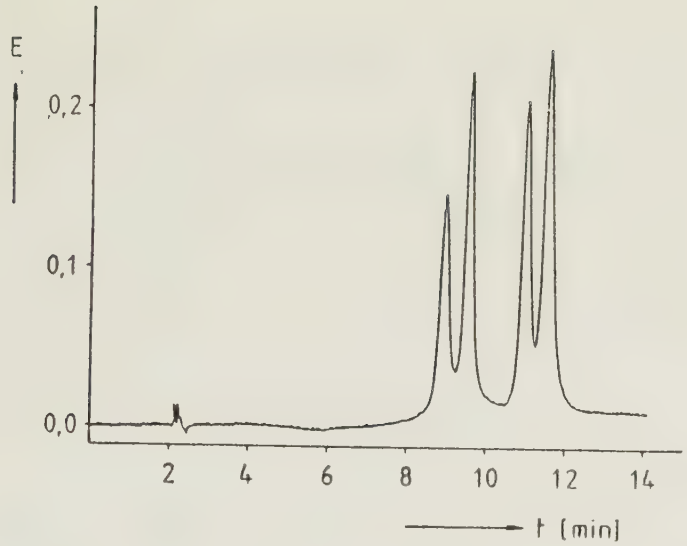


Abb. 6.8 Chromatogramm der Komponenten Methoxychlor, DDD, DDT, DDE bei 249 nm mit dem Eluentenprogramm aus Abb. 6.7 Konzentrationen entsprechend Mischung 1 aus Tab. 9.6

	MC	DDD	DDT	DDE
t_R (min)	8,8	9,4	10,8	11,3
$b_{0,5}$ (min)	0,26	0,21	0,23	0,27
h (10^{-2} cm)	0,39	0,23	0,20	0,26

Tab. 6.7 Chromatographische Parameter für die Komponenten des Modells 3 (t_0 = 2,15 min)

Zur Analyse wurden 4 Meßstellen genutzt. Die Meßstellenauswahl berücksichtigte die relativen Extrema der Differenzspektren (Abb. 9.6 u. 9.7). Zur Eichung wurden wegen des geringeren Aufwandes gegenüber der Verwendung von Reinsubstanzen die Mischungen 1 und 5 der Tabelle 9.6 benutzt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte gruppenweise, der chromatographischen Auflösung entsprechend.

	ε (l mol^{-1} cm^{-1})			
λ (nm)	MC	DDD	DDT	DDE
222	15830	18021	15008	15607
228	15459	21285	17529	15304
234	13816	16510	16809	15647
244	11979	8872	3944	16140
H (l mol^{-1} cm^{-1})	28704	33602	28820	31386

Tab. 6.8 Extinktionskoeffizienten und Empfindlichkeiten für das Modell 3
($\Xi_{MC;DDD} = 0,18$; $\Xi_{DDT;DDE} = 0,40$)

6.8.1 Modell 3: Reduktion auf Zweikomponentenanalysen

Auf Grund der guten chromatographischen Auflösung konnte das Analysenproblem auf die Durchführung von zwei Zweikomponentenanalysen reduziert werden.
Es ergibt sich eine doppelte Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen.
Durch die Hinzunahme weiterer Meßstellen sind die Empfindlichkeiten des Modells 3 für die Komponenten MC und DDD größer als in den Modellen 1 und 2.
Gleichzeitig sind die Selektivitäten gestiegen, es resultieren die Standardabweichungen
$\sigma(c_{MC}) = 1{,}01 \cdot 10^{-5}$ mol/l und $\sigma(c_{DDD} = 1{,}46 \cdot 10^{-5}$ mol/l).
Für die Komponenten DDT und DDE ergeben sich die folgenden Erwartungswerte:
$\sigma(c_{DDT}) = 0{,}50 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $\sigma(c_{DDE}) = 0{,}54 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

	MC	DDD	DDT	DDE
SA_k (10^{-5}mol/l)	1,06	0,30	0,00	0,38
$\bar{c}$ (10^{-4}mol/l)	0,77	0,99	1,01	0,89
SA (10^{-5}mol/l)	0,44			

Tab. 6.9 Sollwertabweichungen der Komponenten in Modell 3

Die Sollwertabweichungen liegen im Bereich der Erwartungswerte.

	MC	DDD	DDT	DDE
$c_{NWG;rein}$ (10^{-6} mol/l)	0,97	0,68	0,85	0,93
c_{NWG} (10^{-6} mol/l)	5,4	3,8	2,1	2,3
m_{NWG} (10^{-7} g)	o,47	0,30	0,19	0,19

Tab. 6.10 Nachweisgrenzen der aufgeführten Substanzen im Modell 3 berechnet für die dosierte Probenlösung

Wegen der Unterschiede in der Anzahl der Proben und deren Konzentrationen werden zu einem Vergleich der Modelle 2 und 3 die prozentual zur mittleren Komponentenkonzentration berechneten Sollwertabweichungen verglichen.

Modell	1		2	
	MC	DDD	MC	DDD
$SA_k/\bar{c}$ (%)	4,8	6,5	13,8	3,0

Tab. 6.11 Vergleich der prozentualen Sollwertabweichungen der Modelle 2 und 3 für die Komponenten MC und DDD

Die prozentualen Sollwertabweichungen des DDD sind auf dem 95% Signifikanzniveau der F-Verteilung

unterschiedlich. Das Modell 3 ergibt bessere Ergebnisse. Für die Komponente MC liefert die Mischung 4 (Tab. 9.6) des Modells 3 eine große Sollwertabweichung. Diese Abweichung führt zu einer schlechten prozentualen Sollwertabweichung des Modells 3 gegenüber Modell 2.
Ein Vergleich der Modelle kann auch über die Nachweisgrenze erfolgen. Die Nachweisgrenzen für die Reinsubstanzen liegen im Modell 3 um den Faktor 2 bis 3 niedriger als im Modell 2. Diese Unterschiede beruhen zu ca. 2/3 auf den höheren Empfindlichkeiten des Modells 3. Die weiteren Unterschiede sind auf die chromatographischen Parameter zurückzuführen. Für die Komponenten MC und DDD stellt das Modell 3 die bessere Analysenmethode dar. Neben den größeren Empfindlichkeiten und höherer Selektivität, wirkt sich der Einsatz der Gradienten-Elution positiv auf die Analysenergebnisse aus.

6.9 Das Sechskomponentensystem: Methoxychlor, DDD,Dieldrin, DDT, DDE, Aldrin

Mit den Modellen 4-6 soll die Leistungsfähigkeit der entwickelten Gerätekombination für die Analyse komplexer Stoffgemische demonstriert werden.

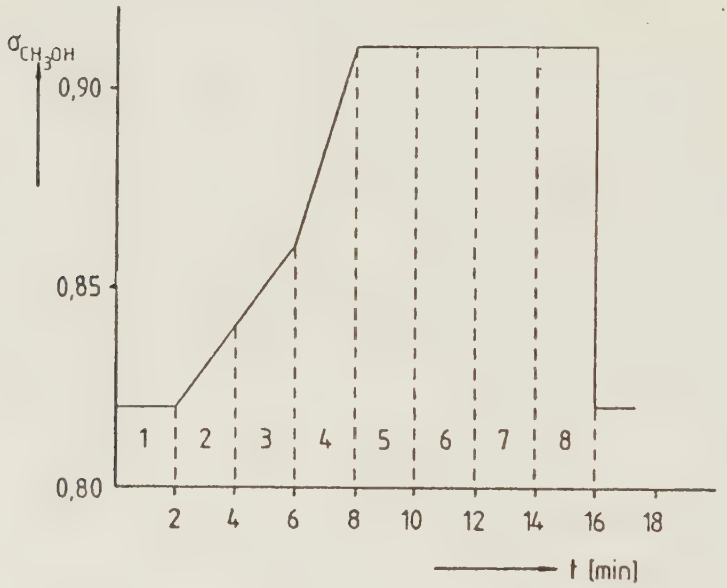


Abb. 6.9 Eluentenprogramm für ein Methanol-Wasser-Gemisch bestehend aus sieben Segmenten

Die chromatographische Auflösung wurde auf einer RP-18 10µm Säule mit Hilfe des in Abbildung 6.9 wiedergegebenen Gradientenprogramms erreicht. Aus dem Chromatogramm (Abb. 6.10) ist ersichtlich,

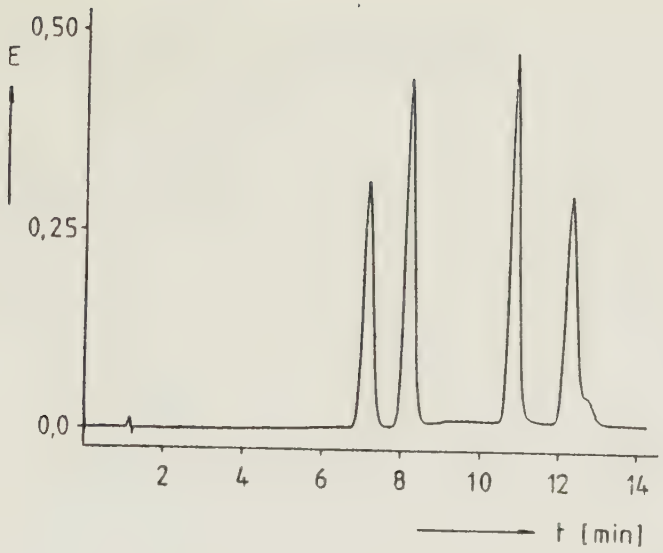


Abb. 6.10 Chromatogramm der Komponenten Methoxychlor, DDD, Dieldrin, DDT, DDE, Aldrin. Die Konzentrationen entsprechen der Mischung 1 aus Tabelle 9.7

daß die Auflösung der Komponenten MC, DDD, DDT und DDE gelingt. Die beiden hochtoxischen Verbindungen Dieldrin und Aldrin werden nicht von den DDD- bzw. DDE-Peaks getrennt. Die Analyse des Aldrin ist hierbei durch die Flanke im DDE-Peak indiziert. Im Falle des Dieldrin ist unter Detektion mit konstanter Wellenlänge keine Unterscheidungsmöglichkeit zum DDD-Peak gegeben. Der resultierende Analysenfehler ist wegen der relativ hohen Toxidität des Dieldrin gravierend.

	MC	DDD	Diel	DDT	DDE	Ald
t_R (min)	7,1	8,2	≈8,2	10,8	12,3	≈12,6
$b_{0,5}$ (min)	0,25	0,25	≈0,25	0,25	0,25	≈0,25
h (10^{-2}cm)	0,56	0,42	0,42	0,24	0,18	≈0,19

Tab. 6.12 Chromatographische Parameter für die Modelle 4-6 (t_0 = 1,15 min)

Die Komponenten Dieldrin und Aldrin weisen keine strukturierten UV-Spektren auf sondern lediglich eine Absorptionsschulter; auf die graphische Darstellung wurde verzichtet. Die Meßstellen konnten so gewählt werden, daß sie in Bezug auf Empfindlichkeit und Selektivität für die Analyse geeignet waren. Die Peakflächen wurden jeweils durch 10 bis 20 Meßpunkte bestimmt. Die Eichung erfolgte peakweise mit den Mischungen 1 und 3 (Tab. 9.7-9).

	ε (l mol^{-1} cm^{-1})					
λ (nm)	MC	DDD	Diel	DDT	DDE	Ald
229	15141	21146	2284	17921	15292	2322
242	12756	9271	583	5696	16266	880
249	8799	9497	256	1555	15281	468
268	3286	14045	140	769	10115	187

Tab. 6.13 Eichkoeffizienten für die Modelle 4-6

6.9.1 Modell 4: Reduktion auf Zweikomponentenanalysen ohne Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen

In diesem Modell wurden zur Analyse nur die Meßstellen 229 nm und 242 nm herangezogen. Die Auswertung der Zweikomponentensysteme geschah bei diesem Vorgehen ohne Fehlerausgleich. Die Einkomponentenanalysen wurden doppelt überbestimmt in der Anzahl der Meßstellen ausgeführt. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 9.4 wiedergegeben. In Tabelle 6.14 sind die Sollwertabweichungen der Analyse angegeben. Sie entsprechen den ebenfalls aufgeführten erwarteten Streuungen der Meßwerte. Die hohe Sollwertabweichung des Dieldrin ist sowohl auf die geringe Empfindlichkeit als auch auf die kleine Selektivität ($\Xi_{DDD;Diel} = 0,16$) zurückzuführen. Die relativ geringe Sollwertabweichung der Komponente DDD geht hierbei zu Lasten des Dieldrin.
Die Analyse des Aldrin ist trotz der vergleichbar geringen Empfindlichkeit durch eine kleinere Sollwertabweichung charakterisiert. Der Grund hierfür ist in der größeren Selektivität des Systems DDE-Aldrin ($\Xi_{DDE;Ald} = 0,44$) gegeben.

Substanz	SA_K (10^{-5}mol/l)	$\bar{c}_k$ (10^{-4}mol/l)	H (l mol^{-1} cm^{-1})	$\sigma(c)$ (10^{-5}mol/l)
HC	1,42	3,27	19798	1,06
DDD	0,55	2,94	23089	6,91
Diel	14,75	4,00	2357	9,89
DDT	1,07	2,85	18804	1,12
DDE	1,89	4,07	22326	2,60
Ald	5,71	5,10	2483	4,59
SA (10^{-5}mol/l)	4,23			

Tab. 6.14 Sollwertabweichung, mittlere Konzentrationen der Komponenten, Empfindlichkeiten und erwartete Streuungen der Analysenergebnisse für Modell 4 ($\Xi_{DDD;Diel} = 0,16$, $\Xi_{DDE;Ald} = 0,49$)

Substanz	$c_{NWG;rein}$ (10^{-6} mol/l)	c_{NWG} (10^{-6} mol/l)	m_{NWG} (10^{-7} g)
MC	2,4		0,21
DDD	2,1	12,9	1,0
Diel	22,5	138,0	13,1
DDT	2,6		0,23
DDE	2,2	5,0	0,40
Ald	20,2	46,0	4,2

Tab. 6.15 Nachweisgrenzen für die dosierten Probelösungen des Modells 4

6.9.2 Modell 5: Zweikomponentenanalysen mit Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen

Die Analyse wurde peakweise ausgeführt. Die getrennten Komponenten waren vierfach in der Anzahl der Meßstellen überbestimmt. Die beiden Zweikomponentenanalysen waren jeweils doppelt überbestimmt.
Die Meßergebnisse des Modells 5 sind in der Tabelle 9.8 aufgeführt. Die Tabelle 6.17 beinhaltet die Sollwertabweichungen, die mittleren Konzentrationen der Komponenten sowie die Empfindlichkeiten und die erwarteten Streuungen der Analysenergebnisse. Die Nachweisgrenzen für die dosierten Probelösungen sind der Tabelle 6.16 zu entnehmen. Die Sollwertabweichungen des Modells 5 liegen in der Größenordnung der Erwartungswerte.

Substanz	$c_{NWG;rein}$ (10^{-6}mol/l)	c_{NWG} (10^{-6}mol/l)	m_{NWG} (10^{-7}g)
MC	2,2		0,19
DDD	1,7	3,3	o,26
Diel	20,0	38,4	3,7
DDT	2,6		0,23
DDE	1,7	2,9	0,23
Ald	19,8	33,3	3,0

Tab. 6.16 Nachweisgrenzen für die dosierten Probelösungen des Modells 5

Substanz	SA_k (10^{-5} mol/l)	$\bar{c}_k$ (10^{-4} mol/l)	H (1 mol^{-1} cm^{-1})	$\sigma(c)$ (10^{-5} mol/l)
MC	1,03	3,27	21913	0,95
DDD	0,82	2,94	28645	1,75
Diel	7,34	4,00	2375	3,11
DDT	0,53	2,85	18884	1,13
DDE	2,03	4,07	28883	1,62
Ald	3,88	5,10	2534	3,30
SA (10^{-5} mol/l)	2,61			

Tab. 6.17 Sollwertabweichung, mittlere Konzentrationen der Komponenten, Empfindlichkeiten und erwartete Streuungen der Analysenergebnisse für Modell 5 ($\Xi_{DDD;Diel} = 0,52$, $\Xi_{DDE;Ald} = 0,59$)

Bei einem Vergleich der Modelle 4 und 5 ist die Sollwertabweichung des Modells 4 erwartungsgemäß größer als die des Modells 5. Mit dem F-Test kann die Signifikanz dieses Unterschiedes jedoch statistisch nicht gesichert werden. Lediglich für die Sollwertabweichungen der Komponente Dieldrin kann auf dem 95%-Signifikanzniveau ein Unterschied festgestellt werden.
Die Nachweisgrenze erweist sich als ein empfindlicher Maßstab zur Charakterisierung des Verfahrens. Da im Modell 4 sowohl die Empfindlichkeiten als auch die Selektivitäten ungünstigere Werte besitzen, resultiert hieraus eine Vergrößerung der Nachweisgrenzen. Im Falle des Dieldrin erreicht die Nachweisgrenze die Größenordnung der dosierten Konzentrationen.
Obwohl die zusätzlichen Meßstellen des Modells 5 für die Komponenten Dieldrin und Aldrin keine hohe Empfindlichkeit aufweisen, tragen diese, wie von Liekmeier (48) vorausgesagt, aber über die Selektivitäten der Zweikomponentensysteme und die Vergrößerung der Empfindlichkeit für die Komponenten DDD und DDE zur Verbesserung des Verfahrens bei.

6.9.3 Modell 6: Dreikomponentenanalyse der Substanzen DDT, DDE, Aldrin

In diesem Modell wurden die Konzentrationen der Substanzen DDT, DDE und Aldrin mittels einer Dreikomponentenanalyse ermittelt. Zur Analyse wurden die vier im Modell 4 benutzten Meßstellen herangezogen. Abweichend von Modell 5 wurde in diesem Modell die chromatographische Auflösung nicht berücksichtigt. Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 9.9 dargestellt.

Substanz	$c_{NWG;rein}$ (10^{-6}mol/l)	c_{NWG} (10^{-6}mol/l)	m_{NWG} (10^{-7}g)
DDT	2,6	10,7	0,95
DDE	1,7	7,0	0,55
Ald	19,8	81,8	7,50

Tab. 6.18 Nachweisgrenzen für die dosierten Probelösungen des Modells 6

Mit dem F-Test wird auf dem 99%-Signifikanzniveau ein Unterschied in den Sollwertabweichungen der Komponenten DDT und Aldrin zwischen den Modellen 5 und 6 festgestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Modellen bezüglich der Sollwertabweichungen der Komponente DDE kann nicht festgestellt werden. Die Gesamtsollwertabweichungen weisen ebenfalls mit der zuvor angegebenen statistischen Sicherheit Unterschiede auf. Die Differenz zwischen der Sollwertabweichung des Aldrin und der erwarteten Streuung der Analysenergebnisse muß auf die geringen Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Analysenprobe

Substanz	SA_x (10^{-5} mol/l)	$\bar{c}_x$ (10^{-4} mol/l)	E (l mol^{-1} cm^{-1})	σ/c_x (10^{-5} mol/l)
DDT	12,2	2,85	18884	4,59
DDE	1,74	4,07	28883	4,00
Ald	26,1	5,10	2534	8,13
SA (10^{-5} mol/l)	13,4			

Tab. 6.19 Sollwertabweichung, mittlere Konzentrationen der Komponenten, Empfindlichkeiten und erwartete Streuungen der Analysenergebnisse des Modells 6
($\Pi\Xi = 0,42$, $\Xi_{DDT;DDE} = 0,85$, $\Xi_{DDT;Ald} = 0,48$, $\Xi_{DDE;Ald} = 0,59$)

und der Nachweisgrenze zurückgeführt werden.
Der Analysenfehler bei der Bestimmung des Aldrins hat einen Einfluß auf die Bestimmung der übrigen Komponenten der Dreikomponentenanalyse. Die beobachtete Verschlechterung der Sollwertabweichung des DDT gegenüber Modell 5 entspricht den Erwartungen, da dieses System die betraglich kleinste Selektivität aufweist und so relativ empfindlich auf Störungen der Bestimmungsgleichungen reagiert. Die Sollwertabweichung des DDE liegt im Bereich der erwarteten Streuung. Abschließend kann festgestellt werden, daß die gute chromatographische Auflösung positive Auswirkungen auf die erhaltenen Analysenergebnisse zeigt. Die Unterschiede zwischen den Modellen 5 und 6 rechtfertigen den hohen apparativen Aufwand zur Erlangung der chromatographischen Auflösung.

7. Zusammenfassung

Es wurde ein automatisiertes Analysenverfahren zur Routine-Bestimmung von polychlorierten Pestiziden entwickelt. Zur Auftrennung der Komponenten der Proben wurde die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie mit der Möglichkeit der Gradienten-Elution eingesetzt. Ein rechnergesteuerter polychromatischer UV-Detektor gestattete auch bei nicht aufgetrennten Komponenten die quantitative Konzentrationsbestimmung durch die ergänzenden Möglichkeiten der Mehrkomponentenanalyse. Die Entwicklungsarbeiten umfaßten folgende Teilgebiete:

1. Es wurde eine Gerätekombination aufgebaut, die die Trennung und die Detektion der Probesubstanzen gestattete. Hierzu wurde ein Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph mit der Möglichkeit der Gradienten-Elution und spektralphotometrischer Detektion eingesetzt.
2. Ein Interface wurde konstruiert, das den rechnergesteuerten elektromechanischen Wellenlängenantrieb des Spektralphotometers und die Meßwerterfassung ermöglicht. Die Positionserfassung des Wellenlängenantriebs erfolgte mit einem optischen Encoder absolut und auf 0,25 nm genau. Die digitalen Meßwerte wurden dekadenweise seriell zum Rechner übertragen.
3. Die zur Gerätesteuerung und Meßwerterfassung erforderlichen Programme wurden erstellt; das Programm HPLC dient zur zyklischen Meßstellenansteuerung, während SCAN zur Aufnahme eines Spektrums benutzt werden kann. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte peakweise nach dem partiellen Verfahren. Zur Integration der Peakflächen konnte die Rechteck-

methode verwendet werden. Die Ergebnisse dieser Methode waren statistisch nicht signifikant von denen der beschriebenen rechenzeitintensiveren Verfahren verschieden. Der Variationskoeffizient der Peakflächenbestimmung steigt bei Unterschreitung von 9 Meßpunkten pro Peak über 4,7% an.
Die graphische Ausgabe von Spektren und Differenzspektren erfolgte mit dem Progamm KURV. Die Differenzspektren wurden zur Meßstellenauswahl verwendet.
4. Das Verfahren wurde durch die Bestimmung der Geräteparameter charakterisiert. Für die Gradienten-Elution wurde eine Methode zur Abschätzung der Retentionszeit erarbeitet. Es wurde ein Verfahren zur Berechnung der Nachweisgrenze aus Geräteparametern und chromatographischen Parametern hergeleitet. Hierbei wurde der Empfindlichkeitsbegriff für überbestimmte Systeme verwendet. Ein systematischer Fehler durch die Dimensionierung der Probeschleifen wurde entdeckt und korrigiert. Eine Methode zur Totzeitbestimmung in Reversed-Phase-Systemen wurde entwickelt.
5. Das entwickelte Analysenverfahren wurde auf die Modellsysteme 1 bis 6 angewandt. Die Analysenfehler konnten aus den Geräteparametern und substanzspezifischen Kenngrößen abgeschätzt werden. Die Sollwertabweichungen entsprachen den erwarteten Streuungen der Meßwerte. Die Nachweisgrenze diente zur Charakterisierung der Modelle. Die chromatographische Auflösung wirkte sich positiv auf die Analysenergebnisse aus.

8. Literaturverzeichnis

(1) G.M. Woodwell, C.F. Wurster, P.A. Isaacson, Science 156 (1967) 821

(2) M. Tswett, Trudy warsavsk obst. Jestesvoipitat. Otd. Biol. 14 (1903) 20

(3) M. Tsewtt, Ber. deutsch. bot. Ges. 24 (1906) 384

(4) R. Kuhn, A. Winterstein, E. Lederer, Z. Physiol. Chem. 197 (1931) 141

(5) A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, Biochem. J. 35 (1941) 1358

(6) G. Damköhler, H. Theile, Angew. Chem. 56 (1943) 353

(7) A.T. James, A.J.P. Martin, Biochem. J. 50 (1952) 679

(8) P.B. Hamilton, D.C. Bogue, R.A. Anderson, Analyt. Chem. 32 (1960) 1782

(9) C.A. Edwards, Residue Reviews 13 (1966) 83

(10) F. Korte, W. Klein, B. Drefahl, Naturw. Rdsch. 23 (1970) 445

(11) M. Oehme, H. Stray, Z. Analyt. Chem. 311 (1982) 665

(12) A. Holden, K.Marsden, Nature 216 (1967) 1274

(13) K. Ballschmiter, H. Buchert, S. Bihler, M. Zell, Z. Analyt. Chem. 306 (1981) 323

(14) J.W. Cook, J. Am. Oil Chemists´Soc. 40 (1973) 313

(15) J.D. Mac Neil, R.W. Frei, J. Chromatogr. Sci. 13 (1975) 279

(16) S.N. Tewari. I.C. Sharma, J. Chromatogr. 131 (1977) 275

(17) J.F. Lawrence, D. Turton, J. Chromatogr. 159 (1978) 207

(18) M.P. Kurhekar, F.C. D'Souza, S.K. Meghal, J. Chromatogr. 147 (1978) 432

(19) H.J. Petrowitz, S. Wagner, Chemiker Ztg. 95 (1971) 331

(20) E.J. Poziamek, E.V. Crabtree, J.W. Mullin, Analyt. Lett. 14A (1981) 825

(21) M.L. Langhorst, L.A. Shadoff, Analyt. Chem. 52 (1980) 2037

(22) L.H. Wright, J. Chromatogr. Sci. 20 (1982) 1

(23) H. Steinwandter, Z. Analyt. Chem. 312 (1982) 342

(24) A. Bacaloni, G. Gpretti, A. Laganà, B.M. Petronoi, M. Ratatori, Analyt. Chem. 52 (1982) 310

(25) V.D. Chmil, Zh. Anal. Khim. 35 (1980) 2413

(26) R.G. Lewis, K.E. Mac Leod, Analyt. Chem. 54 (1982) 310

(27) R.E. Kaiser, Chromatographia 12 (1979) 338

(28) G. Guiochon, Analyt. Chem. 52 (1980) 2002

(29) A.J.P. Martin, I. Halász, H. Engelhardt, J. Chromatogr. 186 (1979) 15

(30) H. Hulpke, U. Werthmann, G. Berger, GIT Fachz. Lab. 25 (1981) 559

(31) R. Thoms, M. Zander, Z. Analyt. Chem. 282 (1976) 443

(32) Chen, Bao, Fang, Lu, Chromatographia 14 (1981) 129

(33) Zhang, Zhou, Bao, Li, Lu, Chromatographia 14 (1981) 135

(34) R.R. Ryall, H.D. Kessler, Intern. Lab. 12 (1982) No. 5 68

(35) Y. Hirata, M. Novotny, J. Chromatogr. 186 (1979) 521

(36) D. Lübbers, W. Niesel, Naturwissenschaften 44 (1957) 59
(37) B. Klabuhn, M. Kuck, H. Goetz, Z. Analyt. Chem. 265 (1973) 265
(38) D. Fechner, B. Seifert, Z. Analyt. Chem. 292 (1978) 193
(39) K.L. Ratzlaff, F.S. Chuang, D.F.S. Natusch, K.R. O'Keefe, Analyt. Chem. 50 (1979) 1799
(40) M.A. Ryan, R.J. Miller, J.D. Ingle, Analyt. Chem. 50 (1978) 1772
(41) R.E. Dessy, W.D. Reynolds, W.G. Nunn, C.A. Titus, G.F. Moler, Clin. Chem. 22 (1976) 1472
(42) A. Junker, G. Bergmann, Z. Analyt. Chem. 272 (1974) 267
(43) A. Junker, G. Bergmann, Z. Analyt. Chem. 278 (1976) 191
(44) A. Junker, G. Bergmann, Z. Analyt. Chem. 278 (1976) 273
(45) P. Zinn, Dissertation, Bochum (1979)
(46) H. Staat, Dissertation, Bochum (1975)
(47) F. Klukas, Dissertation, Bochum (1978)
(48) W. Liekmeier, Dissertation, Bochum (1981)
(49) R. Jacob, Dissertation, Bochum (1981)
(50) R. Ohmacht, I. Halász, Chromatographia 14 (1981) 155
(51) I. Halász, Analyt. Chem. 52 (1980) 1393 A
(52) H. Hemetsberger, W. Maasfeld, H. Ricken, Chromatographia 9 (1976) 303
(53) H. Hemetsberger, M. Kellermann, H. Ricken, Chromatographia 10 (1977) 726
(54) W. Strubert, Chromatographia 6 (1973) 50
(55) H. Elgass, H. Engelhardt, I. Halász, Z. Analyt. Chem. 294 (1979) 97

(56) J.J. Kirkland, J. Chromatogr. Sci. 10 (1972) 593
(57) R.E. Kaiser, Chromatographia 9 (1976) 337
(58) R.E. Kaiser, Chromaotgraphia 9 (1976) 463
(59) G. Guiochon, Chromatographia 11 (1978) 249
(60) J.J. v. Deemter, E.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Chem. Engng. Sci. 5 (1956) 271
(61) A.I.M. Keulemans, A. Kwantes, Vapour Phase Chromatography Butterworth, London, 1957
(62) H.J. Streckert, Diplomarbeit, Bochum 1979
(63) H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer-Verlag, Heidelberg, 1977
(64) I. Halász, Z. Analyt. Chem. 277 (1975) 257
(65) V. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssig-chromatographie, Disterweg-Salle, Frankfurt, 1979
(66) R. Spatz, GIT Fachz. Lab. 25 (1981) 615
(67) J.L.M. van de Venne, J.P.M. Rindt, G.J.M.M. Coenen, C.A.M.G. Cramers, Chromatographia 13 (1980) 11
(68) K. Unger, Merck Kontakte Nr. 2 (1979) 32
(69) K. Unger, Porous Silica, Elsevier, Amsterdam, 1979
(70) H. Ferch, Chem. Ing. Tech. 48 (1976) 922
(71) K. Sobolev, Sov. Prog. Chem. 41 No. 2 (1976) 29
(72) C. Horvath, W. Melander, J. Chromatogr. 125 (1976) 129
(73) L.R. Synder, J.J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, J. Wiley, New York, 1979
(74) H.J. Möckel, T. Freyhold, Z. Analyt. Chem. 308 (1981) 401
(75) H. Colin, G. Guiochon, J. Chromatogr. 158 (1978) 183
(76) J.J. Kirkland, J. Chromatogr. Sci. 9 (1971) 206

(77) A. Nakae, G. Muto, J. Chromatogr. 120 (1976) 47
(78) L.R. Snyder, D.L. Saunders, J. Chromatogr. Sci. 7 (1969) 195
(79) H. Poppe, J. Paanakker, M. Bronckhorst, J. Chromatogr. 204 (1981) 77
(80) M. Pestemer, Anleitung zum Messen von Absorptionsspektren im UV und Sichtbaren, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1964
(81) Autorenkollektiv, Analytikum, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1972
(82) W. Leithe, Umweltschutz aus der Sicht der Chemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1975
(83) Handbook of Analytical Toxicology, CRC, Cleveland, Ohio, 1969
(84) R. Domenjoz, Helv. 29 (1946) 1317
(85) G. Dietrich, H. Stahl, Matrizen und Determinanten, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt, 1978
(86) J. Neumann, H. Goldstine, Bull. Amer. Math. Soc. 53 (1947) 1021
(87) H. Kaiser, Z. Analyt. Chem. 260 (1972) 252
(88) I.N. Bronstein, K.A. Semendjajew, Taschenbuch der Mathematik, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt, 1979
(89) K. Endl. W. Luh, Analysis I, Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden, 1978
(90) A. Savitzky, M.J.E. Golay, Analyt. Chem. 36 (1964) 1627
(91) W. Dietrich, Pers. Mitteilung
(92) H. Kaiser, H. Specker, Z. Analyt. Chem. 149 (1956) 46
(93) L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer Verlag, Heidelberg, 1974
(94) R. Zurmühl, Matrizen, Springer Verlag, Heidelberg, 1961

9. Anhang

9.1 Die Auswertemethode

9.1.1 Die Analyse

Wenn die Anzahl der Meßstellen gleich der Anzahl der Komponenten ist (m = n), so ist die Lösung des Gleichungssystems 6.2

$$\underline{E}_m = \underline{\underline{\varepsilon}}_{m,n} \cdot \underline{c}_n \cdot d$$

- lineare Unabhängigkeit der Einzelgleichungen vorausgesetzt - durch Multiplikation der invertierten Koeffizientenmatrix mit dem Extinktionsvektor möglich.

$$\underline{c}_n = \underline{\underline{\varepsilon}}^{-1}_{n,n} \cdot \underline{E}_n \cdot 1/d \qquad (9.1)$$

Bei einer Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen (m > n) ist eine Verkettung der Matrizen entsprechend Gleichung 9.1 nicht möglich.
Mit Hilfe einer Gauß-Transformation (94) ist eine Lösung des Gleichungssystems 6.2 möglich. Hierzu wird das Gleichungssystem durch die transponierte Extinktionsmatrix erweitert

$$\underline{\underline{\varepsilon}}^{T}_{n,m} \cdot \underline{E}_m = \underline{\underline{\varepsilon}}^{T}_{n,m} \cdot \underline{\underline{\varepsilon}}_{m,n} \cdot \underline{c}_n \cdot 1/d$$

Eine Lösung ist nun durch die Bildung der Inversen und Multiplikation von links möglich

$$\underline{c}_n = [\underline{\underline{\varepsilon}}^{T} \cdot \underline{\underline{\varepsilon}}]^{-1}_{n,n} \cdot \underline{\underline{\varepsilon}}^{T}_{n,m} \cdot \underline{E}_m \cdot 1/d$$

Das Produkt $[\varepsilon^T \cdot \varepsilon]^{-1} \cdot \varepsilon^T$ wird als Linksinverse L bezeichnet.
Die Berechnung der Konzentrationen erfolgt hiermit nach

$$\underline{c}_n = \underline{\underline{L}}_{n,m} \cdot \underline{E}_m \cdot 1/d \qquad (9.2)$$

Dieses Verfahren beinhaltet einen Fehlerausgleich bei der Analyse.

9.1.2 Die Eichung

Für die Berechnung der Extinktionskoeffizientenmatrix werden l = n Eichmischungen benötigt. Bei einer Überbestimmung in der Anzahl der Eichmischungen l > n erfolgt bei Anwendung der Gauß-Transformation ein Fehlerausgleich bei der Berechnung der Eichmatrix. Eine Überbestimmung in der Anzahl der Meßstellen führt nicht zu einem Fehlerausgleich in der Eichmatrix sondern zu einer Vergrößerung der Matrix um jeweils einen Zeilenvektor. Dies führt bei der Analyse zu einem Fehlerausgleich. Aus

$$\underline{\underline{E}}_{m,l} = \underline{\underline{\varepsilon}}_{m,n} \cdot \underline{\underline{c}}_{n,l} \cdot 1/d \qquad (9.3)$$

folgt durch Erweiterung mit der transponierten Konzentrationsmatrix

$$\underline{\underline{E}}_{m,l} \cdot \underline{\underline{c}}^T_{l,n} = \underline{\underline{\varepsilon}}_{m,n} \cdot \underline{\underline{c}}_{n,l} \cdot \underline{\underline{c}}^T_{l,n} \cdot 1/d$$

Eine Verkettung der Matrizen ist nur durch die sogenannte Rechtsmultiplikation möglich

$$\underline{\underline{\varepsilon}}_{m,n} = \underline{\underline{E}}_{m,l} \cdot \underline{\underline{c}}^{T}_{l,n} \cdot [\underline{\underline{c}} \cdot \underline{\underline{c}}^{T}]^{-1}_{n,n} \cdot 1/d$$

Die Konzentrationsmatrizen werden in Analogie zur Analyse als Rechtsinverse R bezeichnet. Hiermit gilt für die Eichung

$$\underline{\underline{\varepsilon}}_{m,n} = \underline{\underline{E}}_{m,l} \cdot \underline{\underline{R}}_{l,n} \cdot 1/d \qquad (9.4)$$

9.2 Rechenprogramme

9.2.1 EIPO

Das Programm EIPO dient zur Berechnung der Eichkoeffizienten. Das Programm ist für die Auswertung der mit dem Programm HPLC aufgenommenen Meßwertdateien bestimmt. Der Verlauf der Grundlinie wird durch eine Grundliniendatei bestimmt.
Die Berechnung der Eichkoeffizienten geschieht nach dem in Abschnitt 9.1.2 beschriebenen Algorithmus. Die Eichung kann mit Reinkomponenten oder mit Komponentengemischen durchgeführt werden. Die Eichmatrix wird in einer Eichdatei gespeichert. Das Flußdiagramm des Programms EIPO ist in Abbildung 9.1 wiedergegeben.

9.2.2 MECO

Mit dem Programm MECO können einzelne Peaks eines Chromatogramms ausgewertet werden. Die Chromatogramme sind hierbei durch Subtraktion einer Grundliniendatei von der Meßwertdatei gegeben. Zur Erfassung dieser Dateien dient auch hier das Programm HPLC. Zur Auswertung nach der in Abschnitt 9.1.1 beschriebenen Methode wird eine von dem Programm EIPO ermittelte Eichmatrix benutzt. Sollen mehrere Peaks eines Chromatogramms nach dieser Methode ausgewertet werden, so besteht die Möglichkeit, jeweils die Eichmatrix zu wechseln. Abbildung 9.2 gibt das Flußdiagramm des Programms MECO wieder.

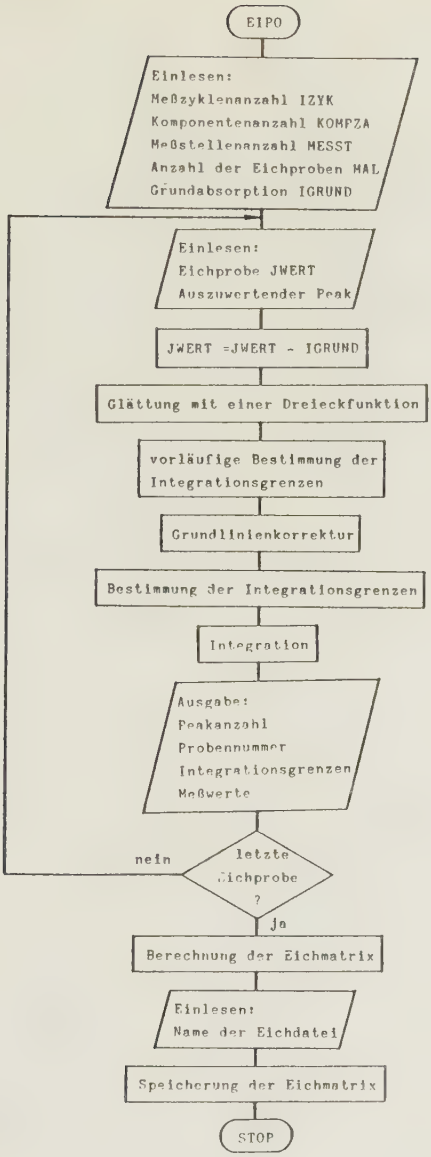


Abb. 9.1 Flußdiagramm des Eichprogramms EIPO

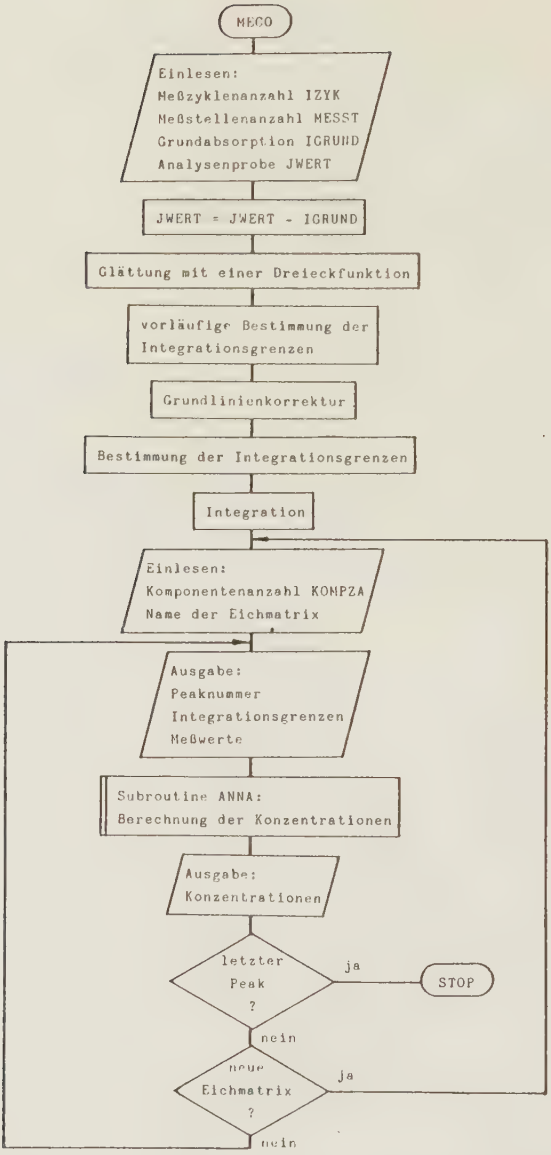


Abb. 9.2 Flußdiagramm des Auswerteprogramms MECO

9.2.3 KURV

Das Programm KURV dient zur graphischen und numerischen Auswertung der mit dem Programm SCAN (3.2.2) aufgenommenen Meßwertdateien. Die Spektren können durch die Subtraktion der Grundabsorption berechnet werden. Es besteht die Möglichkeit,die Spektren zu zeichnen. Durch Eingabe eines graphischen Faktors kann hierbei der Maßstab der Ordinate frei gewählt werden. Neben der graphischen Auswertung einzelner Spektren können auch Differenzspektren berechnet und gezeichnet werden. Der Maßstab für Differenzspektren wird vom Programm an das Zeichenformat angepaßt. Das Programm gibt in diesem Falle den Maßstab der Zeichnung und die relativen Extrema der gezeichneten Funktion aus.

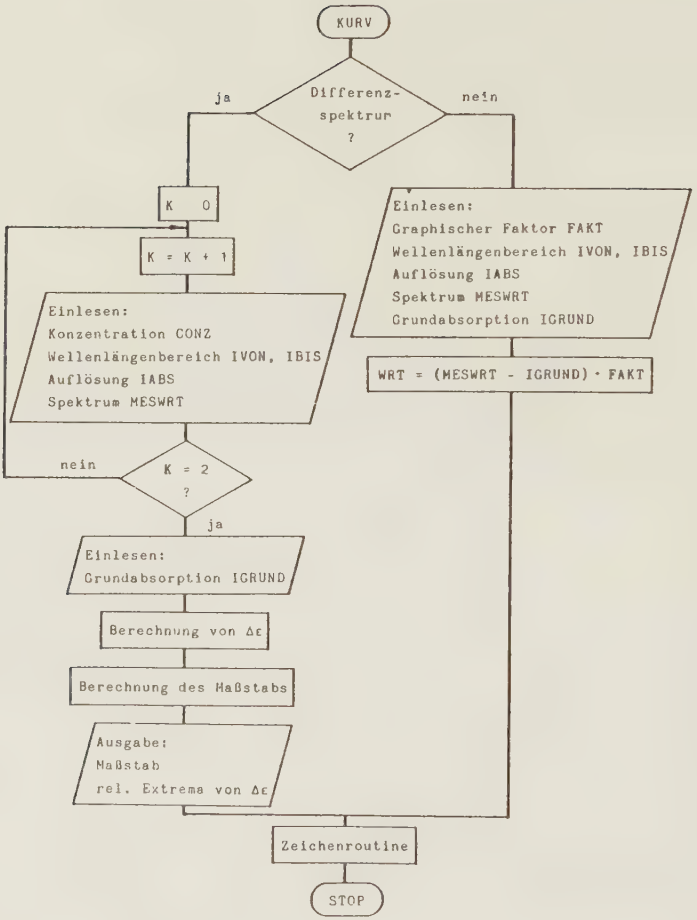


Abb. 9.3 Flußdiagramm des Zeichenprogramms KURV

9.4 Versuchsbedingungen und Meßergebnisse aus Kapitel 6

Versuch	Säule	σ_{CH_3OH}	σ_{H_2O}	$\dot{V}_o$ (ml/min)	Δt (s)	λ (nm)
Meßreihe 6.1	RP-8 7µm	83	17	1,06	5,5	229, 248
Meßreihe 6.2	RP-8 7µm	80	20	1,06	5,5	229, 248
Modelle 1 u. 2	RP-8 7µm	80	20	1,25	5,5	229, 248
Modell 3	RP-8 7µm	s. Abb. 6.		1,00	4,9	222, 228, 234, 244
Modelle 4,5,6	RP-18 10µm	s. Abb. 6.		1,80	6,0	229, 242, 249, 268

Tab. 9.1 Versuchsbedingungen der Meßreihen 6.1, 6.2 und der Modelle 1-6 (V_D = konst. = 25 µl)

	Δt(s)	$\bar{A}_{229}$;rel	V_1(%)	$\bar{A}_{248}$;rel	V_2(%)	$\sum A_{229}/A_{248}$	V(%)	n
1.	5,5	1,000	3,8	1,000	3,9	1,000	0,8	22
	11,0	1,003	4,2	0,985	5,0	1,012	1,4	12
	16,5	0,991	4,7	0,980	4,3	1,012	2,3	9
	22,0	0,972	10,3	0,965	10,6	1,019	4,9	7
2.	5,5	1,000	4,3	1,000	5,1	1,000	1,2	22
	11,0	1,003	4,5	1,000	5,1	1,006	1,3	12
	16,5	0,997	5,6	0,980	5,1	1,012	2,4	9
	22,0	0,966	9,1	0,959	8,9	1,012	4,7	7

Tab. 9.2 Peakflächenbestimmung mit der Rechteckmethode (1) und dem Simpsonschen Näherungsverfahren (2) an den Meßstellen 229 nm und 248 nm bei n Meßpunkten innerhalb der Integrationsgrenzen Flächenangabe relativ zu den mit der Rechteckmethode bei 22 Meßpunkten ermittelten Werten (V = Variationskoeffizient)

	Δt(s)	$\bar{A}_{229;rel}$	V_1(%)	$\bar{A}_{248;rel}$	V_2(%)	$\sum A_{229}/A_{248}$	V(%)	n
3.	5,5	1,000	3,9	1,000	4,3	1,000	0,8	22
	11,0	1,003	4,0	0,995	4,5	1,012	1,0	12
	16,5	0,991	4,9	0,980	4,4	1,012	2,5	9
	22,0	0,960	9,7	0,965	8,8	1,006	4,4	7
4.	5,5	1,000	3,9	1,000	4,3	1,000	0,8	22
	11,0	1,003	4,0	0,995	4,5	1,012	1,0	12
	16,5	0,991	4,9	0,980	4,4	1,012	2,5	9
	22,0	0,972	9,8	0,965	8,7	1,006	4,4	7
5.	5,5	1,000	3,9	1,000	4,3	1,000	0,8	22
	11,0	1,003	4,0	0,995	4,5	1,012	1,1	12
	16,5	0,991	4,9	0,980	4,4	1,012	2,3	9
	22,0	0,972	9,8	0,965	9,3	1,006	4,9	7

Tab. 9.3 Peakflächenbestimmung sukzessiv mit einem Polynom 2. Grades (3) und 4. Grades (4) sowie einem Polynom 2. Grades anschließend an eine Least-Squares-Anpassung über jeweils 5 Meßpunkte (5) für die Meßstellen 229 nm und 248 nm
Flächenangabe relativ zu 1 / n=22 (Tab. 9.2)

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
1. MC	11,3	11,4	0,10
DDD	0	-0,40	-0,40
2. MC	5,66	5,82	0,16
DDD	0	-0,30	-0,30
3. MC	2,26	2,32	0,06
DDD	0	-0,06	-0,06
4. MC	1,13	1,09	-0,04
DDD	0	-0,04	-0,04
5. MC	0	0,09	0,09
DDD	11,5	11,2	-0,30
6. MC	0	-0,10	-0,10
DDD	5,76	5,63	-0,13
7. MC	0	-0,10	-0,10
DDD	2,30	2,28	-0,02
8. MC	11,3	10,9	-0,40
DDD	11,5	11,5	0
9. MC	5,66	5,07	-0,59
DDD	11,5	11,7	0,20
10. MC	8,49	9,34	0,85
DDD	8,64	8,27	-0,37
11. MC	11,3	11,8	0,50
DDD	8,64	8,37	-0,27
12. MC	6,79	7,65	0,86
DDD	5,76	5,21	-0,55

Tab. 9.4 Meßergebnisse des Modells 1
Meßparameter s. Tab. 9.1; Symbole s. Tab. 6.1; ($\Delta = c_{ist} - c_{soll}$)

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
1. MC	11,3	11,3	0
DDD	0	-0,20	-0,20
2. MC	5,66	5,75	0,09
DDD	0	0,05	0,05
3. MC	2,26	2,28	0,02
DDD	0	0,07	0,07
4. MC	1,13	1,08	-0,05
DDD	0	0,03	0,03
5. MC	0	0,20	0,20
DDD	11,5	11,2	-0,30
6. MC	0	0,04	0,04
DDD	5,76	5,74	-0,02
7. MC	0	-0,09	-0,09
DDD	2,30	2,39	0,09
8. MC	11,3	11,3	0
DDD	11,5	11,5	0
9. MC	5,66	5,66	0
DDD	11,5	11,5	0
10. MC	8,49	9,03	0,54
DDD	8,64	9,27	0,63
11. MC	11,3	11,9	0,60
DDD	8,64	9,42	0,78
12. MC	6,79	7,17	0,38
DDD	5,76	5,91	0,15

Tab. 9.5 Meßergebnisse des Modells 2
Meßparameter s. Tab. 9.1

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
1. MC	1,13	1,13	0
DDD	1,15	1,15	0
DDT	1,22	1,22	0
DDE	1,75	1,75	0
2. MC	1,13	1,19	0,06
DDD	1,15	1,16	0,01
DDT	0	0	0
DDE	0	0	0
3. MC	0	0	0
DDD	0	0	0
DDT	1,22	1,22	0
DDE	1,75	1,70	-0,05
4. MC	0,57	0,34	-0,23
DDD	0,58	0,52	-0,06
DDT	0,49	0,49	0
DDE	0,70	0,63	-0,07
5. MC	1,02	1,02	0
DDD	0,58	0,58	0
DDT	0,92	0,92	0
DDE	0,87	0,87	0

Tab. 9.6 Meßergebnisse des Modells 3
Meßparameter s. Tab. 9.1

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
1. MC	5,66	5,64	-0,02
DDD	5,76	5,76	0
Diel	4,29	4,30	0,01
DDT	6,11	6,11	0
DDE	5,24	5,24	0
Ald	5,34	5,33	-0,01
2. MC	1,13	1,22	0,09
DDD	1,15	1,50	0,35
Diel	0	-1,62	-1,62
DDT	1,22	1,23	0,01
DDE	1,75	1,75	0
Ald	0	0	0
3. MC	3,39	3,42	0,03
DDD	3,45	3,45	0
Diel	5,15	5,15	0
DDT	4,89	4,87	-0,02
DDE	8,73	8,65	-0,08
Ald	5,34	5,24	-0,10
4. MC	0	0	0
DDD	0	0	0
Diel	0	0	0
DDT	1,22	1,19	-0,03
DDE	1,75	1,77	0,02
Ald	0	-0,09	-0,09

Tab. 9.7 Meßergebnisse des Modells 4
Meßparameter s. Tab. 9.1

Mischung		c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
5.	MC	4,53	4,46	-0,07
	DDD	3,45	3,37	-0,08
	Diel	8,58	7,54	-0,94
	DDT	0	0	0
	DDE	3,49	3,25	-0,24
	Ald	6,40	5,43	-0,97
6.	MC	6,79	6,71	-0,07
	DDD	0	0	0
	Diel	6,01	6,01	0
	DDT	6,11	6,06	-0,05
	DDE	0	0	0
	Ald	4,27	3,79	-0,48
7.	MC	2,26	2,49	0,23
	DDD	6,91	6,91	0
	Diel	3,43	3,42	-0,01
	DDT	2,44	2,57	0,13
	DDE	3,49	3,36	-0,13
	Ald	7,47	7,79	0,32
8.	MC	0	0	0
	DDD	3,45	3,57	0,13
	Diel	4,29	0,86	-3,43
	DDT	0	0	0
	DDE	6,98	6,50	-0,48
	Ald	8,54	8,50	-0,04

Tab. 9.7 Meßergebnisse des Modells 4 (Fortsetzung)

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
9. MC	5,66	5,40	-0,26
DDD	2,30	2,27	-0,03
Diel	4,29	2,93	-1,36
DDT	3,66	3,44	-0,22
DDE	5,24	5,16	-0,08
Ald	8,54	7,26	-1,28

Tab. 9.7 Meßergebnisse des Modells 4 (Fortsetzung)

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
1. MC	5,66	5,64	-0,02
DDD	5,76	5,76	0
Diel	4,29	4,29	0
DDT	6,11	6,11	0
DDE	5,24	5,23	-0,01
Ald	5,34	5,33	-0,01
2. MC	1,13	1,20	0,07
DDD	1,15	1,28	0,13
Diel	0	0,28	0,28
DDT	1,22	1,22	0
DDE	1,75	1,75	0
Ald	0	0	0
3. MC	3,39	3,41	0,02
DDD	3,45	3,45	0
Diel	5,15	5,15	0
DDT	4,89	4,90	0,01
DDE	8,73	8,63	-0,10
Ald	5,34	5,35	0,01
4. MC	0	0	0
DDD	0	0	0
Diel	0	0	0
DDT	1,22	1,20	-0,02
DDE	1,75	1,77	0,02
Ald	0	-0,09	-0,09

Tab. 9.8 Meßergebnisse des Modells 5
Meßparameter s. Tab. 9.1

Mischung		c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
5.	MC	4,53	4,44	-0.09
	DDD	3,45	3,42	-0.03
	Diel	8,58	7,14	-1,44
	DDT	0	0	0
	DDE	3,49	3,21	-0,28
	Ald	6,40	5,61	-0,79
6.	MC	6,79	6,71	-0.08
	DDD	0	0	0
	Diel	6,01	6,01	0
	DDT	6,11	6,08	-0,03
	DDE	0	0	0
	Ald	4,27	4,27	0
7.	MC	2,26	2,49	0.23
	DDD	6,91	6,91	0
	Diel	3,43	3,43	0
	DDT	2,44	2,52	0,08
	DDE	3,49	3,49	0
	Ald	7,47	7,47	0
8.	MC	0	0	0
	DDD	3,45	3,27	-0,18
	Diel	4,29	5,72	1,43
	DDT	0	0	0
	DDE	6,98	6,48	-0,50
	Ald	8,54	8,49	-0,05

Tab. 9.8 Meßergebnisse des Modells 5 (Fortsetzung)

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
9. MC	5,66	5,62	-0,04
DDD	2,30	2,36	0,06
Diel	4,29	3,95	-0,34
DDT	3.66	3.95	-0,11
DDE	5,24	5,06	-0,18
Ald	8,54	7,69	-0,85

Tab. 9.8 Meßergebnisse des Modells 5
(Fortsetzung)

Mischung	c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
1. DDT	6.11	6,09	-0,02
DDE	5,24	5,24	0
Ald	5,34	5,54	0,20
2. DDT	1,22	1,33	0,11
DDE	1,75	1,75	0
Ald	0	-0,62	-0,62
3. DDT	4,89	4,86	-0,03
DDE	8,73	8,55	-0,18
Ald	5,34	6,19	0,85
4. DDT	1,22	1,20	-0,02
DDE	1,75	1,75	0
Ald	0	0,08	0,08
5. DDT	0	3,49	3,49
DDE	3,49	3,27	-0,22
Ald	6,40	3,16	-3,24
6. DDT	6,11	6,27	0,16
DDE	0	-0,03	-0,03
Ald	4,27	6,29	2,02
7. DDT	2,44	3,27	0,83
DDE	0	-0,03	-0,03
Ald	7,47	3,59	-3,88

Tab. 9.9 Meßergebnisse des Modells 6
Meßparameter s. Tab. 9.1

Mischung		c_{Soll} (10^{-4}mol/l)	c_{Ist} (10^{-4}mol/l)	Δ (10^{-4}mol/l)
8.	DDT	0	0,47	0,47
	DDE	6,98	6,58	-0,40
	Ald	8,54	5,20	-3,34
9.	DDT	3,66	4,16	0,50
	DDE	5,24	5,08	-0,16
	Ald	8,54	4,08	-4,46

Tab. 9.9 Meßergebnisse des Modells 6 (Fortsetzung)

9.4 UV-Spektren

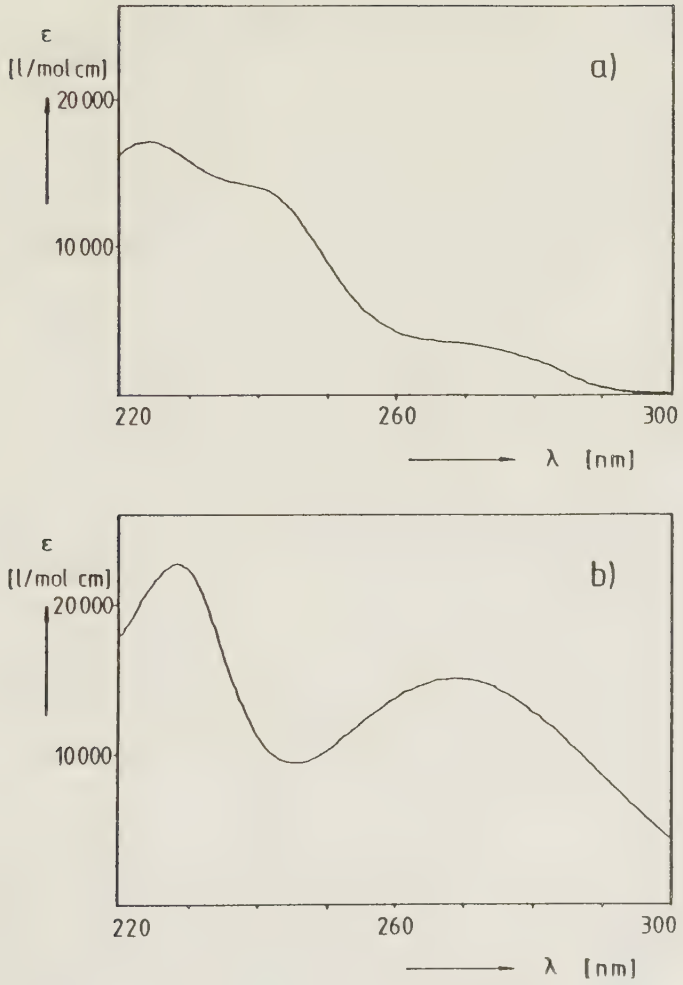


Abb. 9.4 UV-Spektren (Aufnahmebedingungen s. 3.2.2)
a) Methoxychlor ($c = 2{,}83 \cdot 10^{-5}$ mol/l)
b) DDD ($c = 2{,}88 \cdot 10^{-5}$ mol/l)

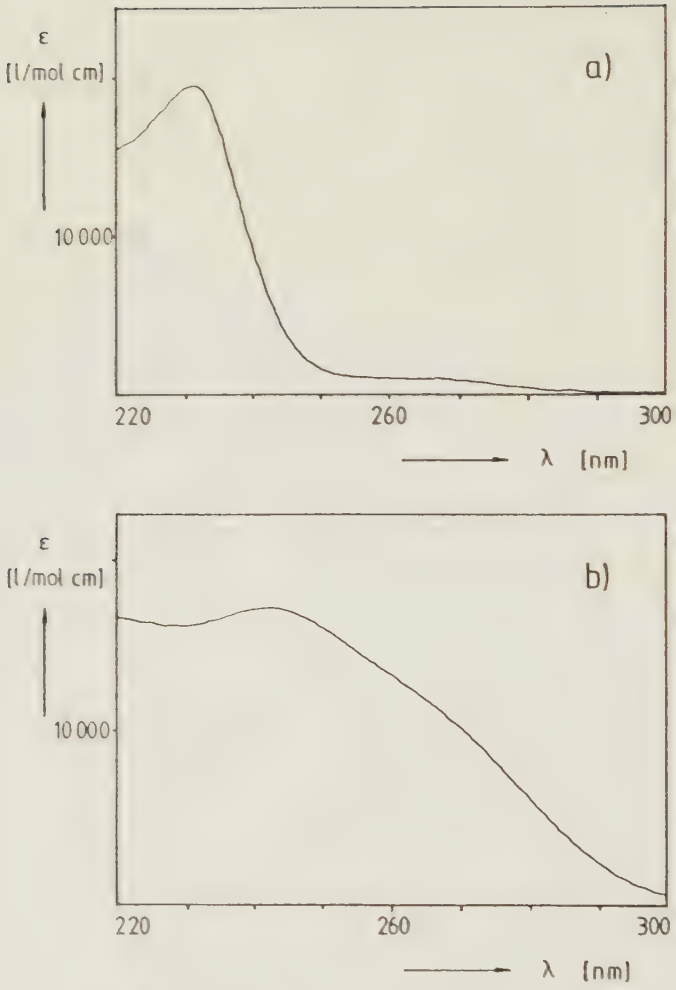
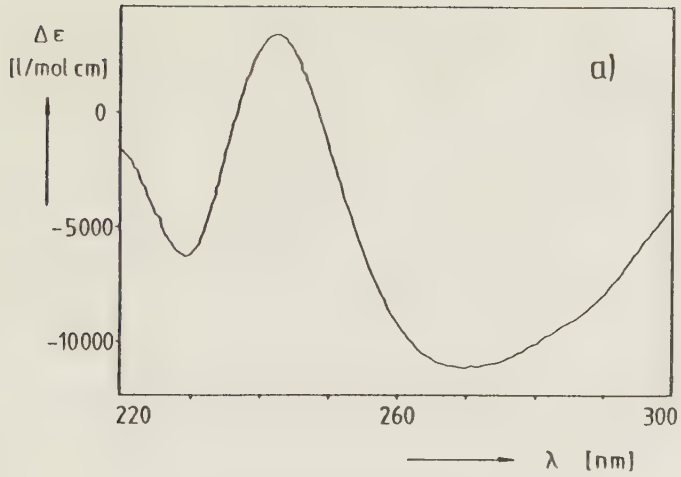
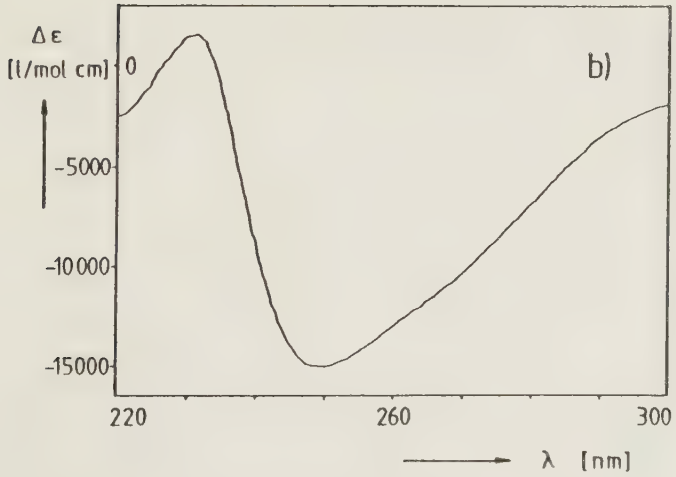
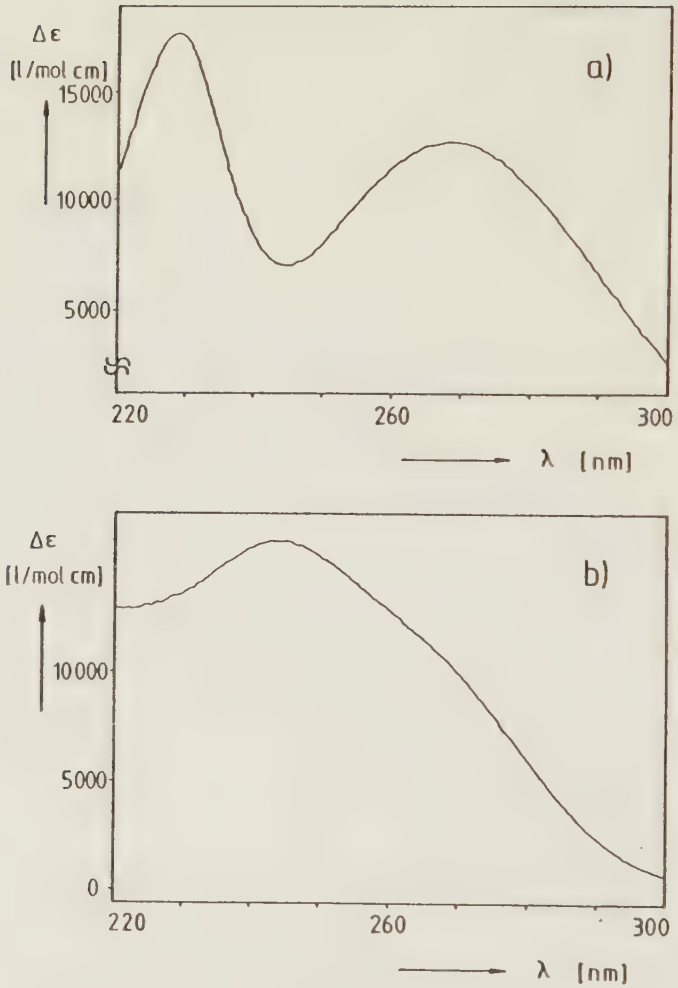


Abb. 9.5 UV-Spektren
a) DDT ($c = 2{,}88 \cdot 10^{-5}$ mol/l)
b) DDE ($c = 2{,}91 \cdot 10^{-5}$ mol/l)





Tab. 9.6 Differenzspektren der Komponenten
a) Methoxychlor und DDD
b) DDT und DDE



Tab. 9.7 Differenzspektren der Komponenten
a) DDD und Dieldrin
b) DDE und Aldrin

Lebenslauf

29.8.1950	geboren als Sohn der Eheleute Hildegard und Hugo Streckert in Witten
1957 - 1961	Besuch der Volksschule in Witten
1961 - 1971	Schüler des Städt. Jungengymnasiums in Witten
24.5.1971	Reifeprüfung
WS 1971/72	Beginn des Chemiestudiums an der Ruhr-Universität Bochum
1.10.1972	Einberufung zum Grundwehrdienst
WS 1973/74	Wiederaufnahme des Chemiestudiums an der Ruhr-Universität
28.5.1979	Einreichung der Diplomarbeit
Juni 1979	Beginn der Doktorarbeit am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum
17.7.1981	Eheschließung mit Gabriele Streckert, geb. Steinforth